

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Tereza Vyvadilová

PŘÍSPĚVEK K OPTIMALIZACI PARAMETRŮ SPECIAČNÍ ANALÝZY As
ZALOŽENÉ NA SELEKTIVNÍM GENEROVÁNÍ HYDRIDŮ V
USPOŘÁDÁNÍ PŘÍMÉHO PŘENOSU S DETEKCÍ ATOMOVÝM
ABSORPČNÍM SPEKTROMETREM

Contribution to optimization of parameters of speciation analysis of As
based on selective hydride generation in direct transfer mode and
detection by atomic absorption spectrometry

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jiří Dědina, DSc.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

podpis

Tato práce byla vypracována v Laboratoři stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie Akademie věd České republiky, v.v.i, Vídeňská 1083, Praha 4, 142 20

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat všem, kteří mi vycházeli vstříc při řešení dílčích problémů mé diplomové práce. V první řadě děkuji svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Dědinovi, DSc. a svému konzultantovi RNDr. Stanislavu Musilovi, Ph.D. za odborné vedení, množství cenných rad a také za jejich podporu a trpělivost během celé práce. Poděkování patří také RNDr. Tomáši Matouškovi, Ph.D., RNDr. Janu Kratzerovi, Ph.D. a RNDr. Milanu Svobodovi, Ph.D. za ochotu, vstřícný přístup a za vytvoření přátelského prostředí.

Rovněž bych ráda poděkovala svým rodičům a svému manželovi za veškerou pomoc, podporu a umožnění studia na vysoké škole.

Abstrakt

Předkládaná práce se zabývá optimalizací parametrů speciální analýzy založené na selektivním generování hydridů v uspořádání přímého přenosu hydridů a on-line atomizace v atomovém absorpčním spektrometru.

V první části práce byly studovány procesy probíhající při generování. Důležitým indikátorem reakcí probíhajících v generátoru je množství vodíku (vzniklé rozkladem NaBH_4), který je následně přiváděn do atomizátoru. V této části práce byl vyvinut zcela nový přístup pro stanovení přívodu vodíku do atomizátoru. Ve druhé části práce byly provedeny experimenty pro posouzení vlivu relevantních parametrů atomizátoru a atomových absorpčních spektrometrů na základní analytické charakteristiky stanovení arsenu založeného na generování hydridů. Byly využity tři atomové absorpční spektrometry a porovnány tři zdroje záření. Za nejdůležitější analytickou charakteristiku byla zvolena mez detekce, která je dána rozptylem měření série slepých vzorků a citlivostí. Nejlepších hodnot meze detekce bylo dosaženo při použití bezelektrodové výbojky.

Klíčová slova: generování hydridů, arsen, speciální analýza, atomová absorpční spektrometrie

Abstract

The presented thesis deals with optimization of parameters speciation analysis based on a selective hydride generation in a direct transfer mode of hydrides and on-line atomization in an atomic absorption spectrometer.

In the first part of the thesis processes during generation were investigated. Important indicator of a reactions taking place in a generator is volume of hydrogen (created by decomposition of NaBH_4) which is subsequently introduced to the atomizer. In this part of the thesis a new approach to determine a flow rate of hydrogen delivered to the atomizator was developed. An influence of relevant paremeters of the atomizers and atomic absorption spectrometers on basic analytical characteristics of arsenic determination based on hydride generation was performed in the second part. Three atomic absorption spectrometers were used and three sources of radiation were compared. The most important analytic characteristic was the limit of detection which is influenced by standard deviation of measurement values of blank samples and by sensitivity. The best values of the limit of detection were achieved with electrodeless discharge lamps.

Key words: hydride generation, arsenic, speciation analysis, atomic absorption spectrometry

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
Úvod	10
1 Teoretická část.....	11
1.1 Arsen	11
1.1.1 Arsen a jeho sloučeniny.....	11
1.1.2 Výskyt.....	11
1.1.3 Toxicita.....	11
1.2 Atomová absorpční spektrometrie	12
1.3 Generování těkavých sloučenin	14
1.4 Generování hydridů	14
1.4.1 Vznik hydridů	16
1.4.2 Metody generování hydridů.....	16
1.4.3 Atomizace hydridů v atomizátoru	18
1.5 Interference	22
1.6 Speciační analýza.....	24
1.6.1 Selektivní generování hydridů.....	24
1.6.2 Generování substituovaných hydridů	26
1.6.3 Postkolonové generování hydridů	26
2 Experimentální část.....	27
2.1 Použité chemikálie	27
2.2 Instrumentace	28
2.2.1 Atomový absorpční spektrometr Perkin-Elmer 503 bez korekce pozadí .	28
2.2.2 Atomový absorpční spektrometr Perkin-Elmer Aanalyst 800 s deuteriovou korekcí pozadí	29

2.2.3	Atomový absorpční spektrometr GBC Savantaa.....	30
2.3	Aparatury pro generování hydridů.....	31
2.3.1	Separátor fází.....	33
2.3.2	Atomizátor.....	34
2.4	Popis experimentů.....	34
2.4.1	Perkin Elmer 503	35
2.4.2	Perkin Elmer Aanalyst 800.....	37
2.4.3	GBC Savanta	37
2.5	Zpracování naměřených dat.....	38
2.5.1	Použité počítačové programy	38
2.5.2	Statistické vyhodnocení dat	38
3	Výsledková část a diskuze.....	41
3.1	Úvodní experimenty - vliv koncentrace redukčního činidla.....	42
3.2	Procesy probíhající při generování a atomizaci	45
3.2.1	Vliv pH reakční směsi	47
3.2.2	Vývoj metody stanovení přívodu vodíku do atomizátoru	49
3.2.3	„Titrace“ vodíku kyslíkem – indikace nespecifickou absorpcí kyslíku ...	50
3.2.4	„Titrace“ vodíku kyslíkem – indikace detekcí volných atomů analytu....	54
3.2.5	Aplikace metody stanovení přívodu vodíku do atomizátoru.....	59
3.3	Vliv parametrů atomizátorů a spektrometrů na základní analytické charakteristiky.....	61
3.3.1	Srovnání šumu základní linie měření pro různé parametry atomizátorů a spektrometrů.....	61
3.3.2	Perkin-Elmer 503: kalibrační závislosti, LOD a LOQ	66
3.3.3	Perkin-Elmer Aanalyst 800: kalibrační závislosti, LOD a LOQ	71
3.3.4	GBC Savantaa: kalibrační závislosti, LOD a LOQ	74

4	Závěr.....	77
5	Použitá literatura	79

Seznam použitých zkratk

AAS	atomová absorpční spektrometrie
As	arsen
CFA	kontinuální průtoková analýza
DIV	deionizovaná voda
DMAs ^{III}	kyselina dimethylarsenitá
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDL	bezelektrodová výbojka
ETA-AAS	atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
F-AAS	atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací
FIA	průtoková injekční analýza
FIT	atomizátor typu plamínek v křemenné trubici
HCL	výbojka s dutou katodou
HG-AAS	atomová absorpční spektrometrie s generováním hydridů
i.d.	vnitřní průměr
iAs ^{III}	kyselina trihydrogenarsenitá
iAs ^V	kyselina trihydrogenarseničná
IUPAC	mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MAs ^{III}	kyselina methyarsenitá
PP	peristaltická pumpa
PTFE	polytetrafluorethylen - teflon
QTA	konvenční křemenný atomizátor

Úvod

Arsen je toxický prvek, hojně se vyskytující v životním prostředí. Kvůli rozdílné toxicitě jednotlivých forem je potřebné mít k dispozici dostatečně citlivou a rychlou analytickou metodu vhodnou pro stanovení jednotlivých forem arsenu. Obecným cílem této práce bylo přispět k optimalizaci parametrů speciální analýzy založené na selektivním generování hydridů v uspořádání přímého přenosu hydridů a on-line atomizace v atomovém absorpčním spektrometru.

Konkrétními cíly této diplomové práce bylo:

1. Přispět k porozumění procesů probíhajících při generování a atomizaci hydridů za podmínek speciální analýzy As založené na selektivním generování hydridů s použitím předredukčního činidla L-cysteinu.
2. Charakterizovat vliv relevantních parametrů atomizátoru a atomových absorpčních spektrometrů na základní analytické charakteristiky stanovení As založeného na generování hydridů: citlivosti, zakřivení analytických grafů a meze detekce a stanovitelnosti.

1 Teoretická část

1.1 Arsen

1.1.1 Arsen a jeho sloučeniny

Arsen je metaloid, patřící do V. hlavní skupiny periodické soustavy prvků. Existuje v několika alotropických modifikacích. Nejběžnější je kovový, šedý arsen [1]. Arsen se může vyskytovat v anorganické a organické formě. Ve sloučeninách se nalézá v oxidačních stavech $-III$, $+III$ a $+V$ [2].

V textu práce jsou pro sloučeniny arsenu používány následující zkratky: iAs^{III} pro kyselinu trihydrogenarsenitou, iAs^V pro kyselinu trihydrogenarseničnou, MAs^{III} a DMA^{III} pro kyselinu methylarsenitou a dimethylarsenitou.

1.1.2 Výskyt

Arsen se nachází ve všech složkách životního prostředí. Zdroj arsenu může být přírodního nebo antropogenního původu [2]. Ve volném stavu se vyskytuje zřídka, převážně je nalezen v kombinaci se sírou, kyslíkem a železem. Arsen se vyskytuje ve více než 245 minerálech [3], z nichž nejběžnějšími jsou arsenopyrit ($FeAsS$), realgar (AsS) a auripigment (As_2S_3) [4], [5]. V zemské kůře je obsah arsenu přibližně $2-3 \mu g g^{-1}$. Mezi antropogenní zdroje arsenu patří zejména přípravky na ochranu dřeva, herbicidní a insekticidní prostředky, spalování fosilních paliv, polovodičový a sklářský průmysl [2], [6].

1.1.3 Toxicita

Toxicita arsenu je spojena s jeho oxidačním stavem a druhem sloučeniny. Anorganické formy jsou vysoce toxické. iAs^{III} se silně váže na thiolové skupiny aminokyselin v proteinech a inhibuje tak řadu enzymatických systémů [4]. Silná vazba

mezi iAs^{III} a sírou může být důvodem, proč se arsen hromadí v keratinu vlasů a nehtů. iAs^V nereaguje s aktivními místy enzymů přímo, ale nejprve se redukuje na iAs^{III} . Přestože je iAs^{III} pokládán za toxičtější formu, iAs^V , jako arseničnan, může nahrazovat fosfát a narušovat tak biochemické reakce [2], [7], [8].

Akutní otravy se projevují zejména problémy trávicí soustavy, které vedou k celkové dehydrataci organismu a oběhovému selhání. Dochází také k poškození jater a ledvin. Projevy chronické expozice arsenem jsou velmi různorodé. Může se jednat o poškození kůže, kardiovaskulární choroby, trávicí potíže nebo poškození nervové soustavy. Objevit se také může rakovina močového měchýře nebo plic [9].

Toxicita arsenu klesá v pořadí arsan > anorganické arsenitany > organické trojmocné sloučeniny > anorganické arseničnany > organické pětímocné sloučeniny > arsoniové sloučeniny > elementární arsen [10]. Nedávné studie však ukazují, že trojmocné methylované formy (MAs^{III} , $DMAs^{III}$) působí účinněji na rozpad DNA, než anorganické trojmocné formy arsenu [11], [12], [13]. Arsenobetain a arsenocholin jsou považovány za netoxické [14].

1.2 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je jednou z nejrozšířenějších analytických metod. Umožňuje stanovení více než 60 prvků periodické tabulky. Jejím principem je absorpce elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu, které vznikají v atomizátorech. Volné atomy v plynném stavu absorbují fotony určité energie, záření o určité vlnové délce. Energetická hodnota fotonů je charakteristická pro určitý druh atomů a počet absorbovaných atomů je mírou množství stanovovaných atomů [15].

První atomový absorpční spektrometr byl sestaven v roce 1953 Walshem. Nyní je metoda AAS využívána jako jedna ze základních metod stanovení prvků. Podle způsobu atomizace můžeme metody dělit do tří skupin: AAS s plamenovou atomizací (F-AAS), AAS s elektrotermickou atomizací (ETA-AAS) a AAS s generováním těkavých sloučenin [16].

Přístroj pro AAS se skládá ze čtyř základních částí: zdroje primárního záření, absorpčního prostředí s volnými atomy v plynném stavu, monochromátoru a detekčního systému.

Primární záření musí mít vysokou zářivou energii a dlouhodobě stabilní zářivý tok. V AAS se využívají tyto zdroje primárního záření:

- výbojka s dutou katodou (HCL) je nejčastěji a nejdéle používaným zdrojem primárního záření. HCL je lampa s dutou, obvykle válcovou, katodou, obsahující jeden nebo více prvků analytu. Anoda je většinou vyrobena z wolframu nebo niklu. Výbojka je plněna vzácným plynem (neon, argon). Mezi elektrody se vkládá napětí 100-200 V a napájecí proud výbojky je v jednotkách miliampérů. Vložením napětí na elektrody se vzácný plyn ionizuje srážkami s urychlenými elektrony. Kationty vzácného plynu bombardují povrch katody a vyrážejí odtud atomy kovu. Atomy kovu jsou excitovány srážkami s ionty a elektrony plazmatu a při následném vyzáření fotonu se vrací do základního stavu [16], [17].
- superlampa funguje na principu výbojky s dutou katodou. Intenzita záření je však zvýšena dalším, pomocným, výbojem mezi dvěma pomocnými elektrodami před ústím katody. Tyto výbojky se vyznačují vyšší intenzitou záření, lepší linearitou kalibračních závislostí než HCL a výhodou jsou také nižší pořizovací náklady ve srovnání s EDL [16].
- bezelektrodová výbojka (EDL) je skleněná baňka s křemenným vstupním okénkem plněným vhodným množstvím prvku ve směsi jako kov a těkavá sloučenina (např. halogenid kovu). Výbojka je umístěna v cívice radiofrekvenčního generátoru nebo v rezonanční dutině mikrovlnného generátoru. Oba tyto generátory dodávají energii k vytvoření stabilního výboje. EDL emitují velmi úzké čáry s intenzitou až o řád vyšší než HCL. V současné době jsou bezelektrodové výbojky v AAS dobře zavedeny a pro řadu prvků nahrazují ostatní lampy. Toto je typické zejména pro arsen, kde EDL poskytuje dvojnásobné zlepšení citlivosti a lepší limity detekce ve srovnání s HCL [16] [17].

Nastavení parametrů spektrometru, jako je vlnová délka nebo šířka štěrby, má vliv na stanovení. V AAS se používá šířka štěrby v rozmezí 0,1 – 2 nm. Se snižující se šířkou štěrby roste citlivost, ale také i šum. Naopak při použití větší šířky štěrby se šum snižuje na úkor snížení citlivosti a zhoršení linearit kalibračních závislostí. Proto je nutné najít optimální poměr mezi citlivostí a šumem.

1.3 Generování těkavých sloučenin

Generování těkavých sloučenin je velmi populární technika díky své jednoduchosti a nízké ceně vybavení. Nicméně hlavní výhoda spočívá v principu této metody, který zahrnuje nakoncentrování a separaci analytu od matrice. To vede k vysoké citlivosti a k významnému potlačení interferencí při atomizaci [18]. Kromě toho vysoká účinnost transportu analytu ze vzorku do detektoru poskytuje mimořádnou detekční mohutnost [19].

Nejstarším přístupem ke generování těkavých sloučenin je generování studených par, tedy volných atomů rtuti. Tato technika pro stanovení rtuti je stále široce využívána. V současné době jsou nejčastěji generovanými sloučeninami binární hydridy arsenu, selenu, antimonu, bismutu, germania, olova, teluru a cínu. Z těchto prvků tvoří bismut, selen a telur pouze binární hydridy. Ostatní prvky mohou poskytovat také různé analyticky významné alkyl-substituované hydridy [20]. Již bylo popsáno i generování analyticky užitečných těkavých forem stříbra, zlata, kobaltu, mědi, niklu a zinku [21], [22].

1.4 Generování hydridů

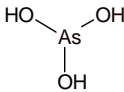
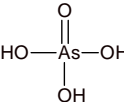
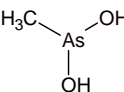
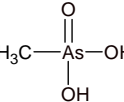
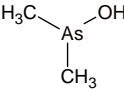
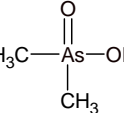
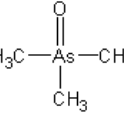
Generování hydridů ve spojení s AAS bylo poprvé popsáno Holakem v roce 1967 [23]. Tato technika se začala používat na počátku 70. let 20. století, za účelem vyřešení problematiky spojené se stanovením arsenu a selenu metodou F-AAS [18].

Procedura stanovení hydridotvorných prvků je složena ze dvou nezávislých kroků. Prvním krokem je generování hydridů, v druhém kroku následuje atomizace hydridů

a detekce. Generování hydridů spočívá v uvolnění hydridu z roztoku vzorku, tedy v konverzi analytu na hydrid, v jeho přechodu do plynné fáze a v následném transportu uvolněného hydridu proudem nosného plynu do atomizátoru [20]. Nejčastěji je používáno chemické generování hydridů. Alternativou je elektrochemické [24], [25], [26] nebo fotochemické generování [20], [27], [28].

Přehled sloučenin arsenu, které tvoří těkavé hydridy je uveden v Tab.1.1.

Tab.1.1 Hydridotvorné sloučeniny arsenu

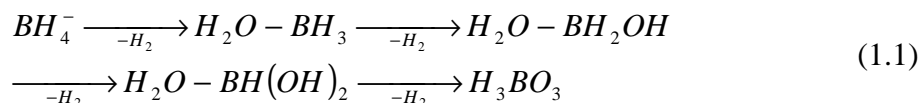
název sloučeniny	zkratka	strukturní vzorec
trihydrogenarsenitá kyselina	iAs ^{III}	
trihydrogenarseničná kyselina	iAs ^V	
methylarsenitá kyselina	MAs ^{III}	
methylarseničná kyselina	MAs ^V	
dimethylarsenitá kyselina	DMA ^{III}	
dimethylarseničná kyselina	DMA ^V	
oxid trimethylarseničný	TMA ^V O	

1.4.1 Vznik hydridů

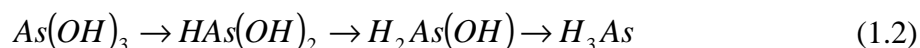
Pro převedení analytu na hydrid lze využít využití různých reakčních činidel. Nejstarší technika vedoucí k tvorbě hydridu byla založena na reakci kovu v prostředí kyseliny. Nejčastěji se jednalo o systém zinek/kyselina chlorovodíková [29].

V současné době je nejčastěji používaným redukčním činidlem tetrahydridoboritan sodný. Reakce s analytem probíhá v kyselém prostředí. Původně bylo předpokládáno, že analyt reaguje s vodíkem ve stavu zrodu, vzniklým rozkladem tetrahydridoboritanu [30].

Později bylo prokázáno, že dochází k postupné hydrolyze tetrahydridoboritanu v kyselém prostředí. Hydrolyza probíhá přes tři meziprodukty a konečným produktem je kyselina boritá (viz schéma 1.1). Každý krok je doprovázený ztrátou jedné B-H vazby. V reakční směsi jsou tak čtyři specie obsahující nejméně jednu B-H vazbu.



Analyt je postupně redukován meziprodukty hydrolyzy na příslušný hydrid [20], [29]. Reakce spočívají v postupném přenosu vodíku z BH_4^- a produktů hydrolyzy na analyt. S analytem může reagovat každá ze čtyř specií. Konverzi analytu na hydrid znázorňuje následující schéma 1.2. Každý krok zahrnuje nahrazení jedné hydroxylové skupiny vodíkem [20], [31].



1.4.2 Metody generování hydridů

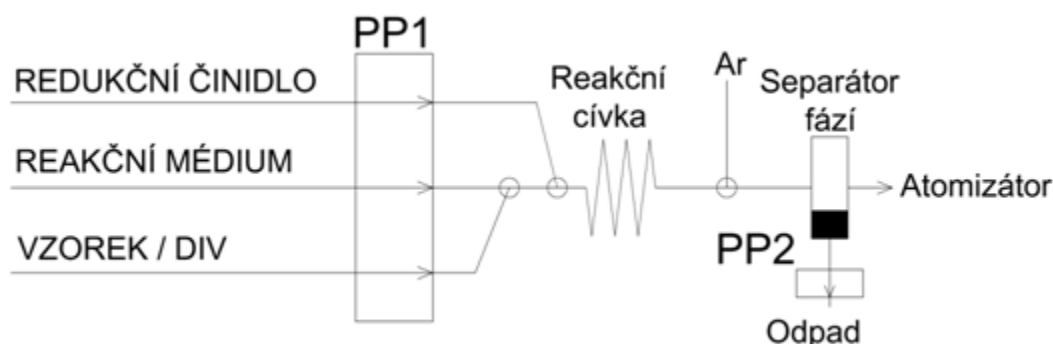
Existují dvě základní metody generování hydridů:

- při přímém přenosu je hydrid uvolněný z roztoku vzorku veden přímo do atomizátoru
- při kolekci je hydrid shromažďován v kolekčním zařízení a poté uvolněn a veden do atomizátoru najednou [20]

1.4.2.1 Metody přímého přenosu

V metodách přímého přenosu se využívá kontinuální generování (CFA), dávkování do proudu (FIA) a dávkové uspořádání (batch).

V kontinuálním generátoru je konstantní tok vzorku smíchán s konstantním tokem redukčního činidla a reakčního média a reakční směs je následně vedena přes reakční cívku do separátoru fází. Zde dochází k oddělení plynné fáze od zreagované kapaliny, která je vedena do odpadu. Hydrid je přiváděn proudem nosného plynu do atomizátoru. Schéma kontinuálního generátoru je znázorněno na Obr. 1.1.



Obr. 1.1 Schéma kontinuálního generátoru; PP1, PP2 – peristaltické čerpadlo, DIV – deionizovaná voda

Generátor dávkování do proudu je analogický jako pro kontinuální generování, s tím rozdílem, že konstantní tok vzorku je nahrazen tokem nosiče. Do proudu nosiče je pomocí dávkovacího ventilu injektován vzorek.

U kontinuálního generátoru pozorujeme po dosažení rovnovážného stavu konstantní signál. U dávkování do proudu má signál tvar nesymetrického píku se strmou

náběžnou a méně strmou sestupnou hranou. Výška signálu je vždy menší než u kontinuálního generování kvůli disperzi v kapalně a plynné fázi [19].

Dávkový generátor je nádoba vyrobená ze skla nebo plastu, která slouží současně jako reaktor a separátor fází. Vzorek je umístěn do generátoru a redukční činidlo je k němu přiváděno peristaltickým čerpadlem nebo manuálně pomocí injekční stříkačky. Přiváděný nosný plyn pomáhá usnadnit uvolnění hydridu z kapalně fáze a transportuje uvolněný hydrid do atomizátoru. Po ukončení reakce je zreagovaná směs odstraněna do odpadu a generátor je vypláchnut. Získaný signál má tvar píku [20].

1.4.2.2 Kolekční metody

Kolekční generátor se skládá z reakční nádoby a kolekčního zařízení. Jako reakční nádoba se nejčastěji používá dávkový generátor, ale je možné i použití generátoru kontinuálního. Po kompletním uvolnění hydridu z reakční nádoby se nashromážděný hydrid uvolní z kolekčního zařízení a je veden do atomizátoru [18].

V současné době se používá výhradně kolekce vymrazováním. Ke kolekci slouží kryogenní past, tvořená obvykle U-trubicí, ponořenou v kapalném dusíku. Po ohřevu U-trubice je zachycený hydrid uvolněn a unášen proudem nosného plynu do atomizátoru [32], [33].

Hlavní výhodou kolekce vymrazováním je možnost zachytit hydrid z velkého objemu vzorku, následně jej uvolnit a transportovat velmi rychle do atomizátoru. Nevýhodou kryogenní kolekce je časová náročnost a obtížná automatizace [19], [20], [34].

1.4.3 Atomizace hydridů v atomizátoru

V atomizátoru dochází k převodu hydridu na volné atomy. Atomizace může probíhat v difúzním plameni inertní plyn-vodík, v grafitovém atomizátoru, v externě vyhřívané křemenné trubici a v atomizátoru typu plamínek v křemenné trubici [18], [35].

Ideální atomizátor by měl splňovat tato kritéria:

- kompletní převod analytu na volné atomy
- žádné reakce volných atomů v optické cestě
- dlouhá doba setrvání volných atomů v pozorovaném objemu pro dosažení vysoké citlivosti
- minimální příspěvek šumu pro dosažení nízkého limitu detekce
- prekoncentrace analytu v atomizátoru
- uživatelská přívětivost, robustnost atomizátoru
- nízké provozní a investiční náklady

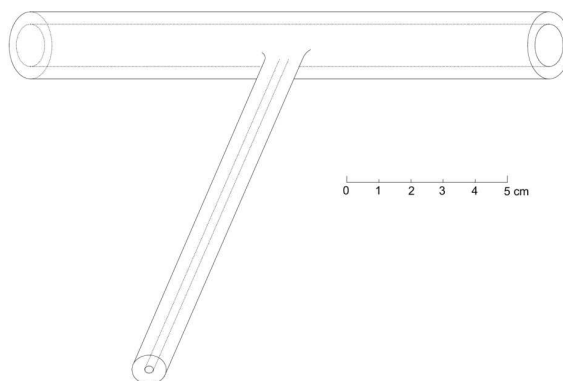
Reálné atomizátory však mohou splňovat jednotlivá kritéria pouze v určité míře [36].

Při atomizaci v difúzním plameni je hydrid unášen z generátoru proudem nosného plynu přímo do plamene. Kvůli velkému zředění analytu složkami plamene poskytuje nízkou citlivost a proti jiným hydridovým atomizátorům má také vysokou nespecifickou absorpci.

Pro atomizaci v grafitových atomizátorech existují dva přístupy: on-line atomizace a in-situ kolekce. Při on-line atomizaci je generovaný hydrid veden přímo do grafitové kyvety, předehřáté na atomizační teplotu. Tento přístup poskytuje dobrou odolnost vůči interferencím, avšak nevýhodou je nízká citlivost a problémy spojené s interface, který musí vydržet vysoké atomizační teploty a také zabránit ztrátám hydridu. V současné době se on-line atomizace v grafitových atomizátorech téměř nevyužívá [36].

In-situ kolekce používá grafitový atomizátor jako kolekční médium a následně jako atomizační celu. Hydrid přiváděný z generátoru je zachycen v grafitovém atomizátoru, který je zahřátý na teplotu 200 až 600 °C. Pro přívod hydridu se používá křemenná nebo skleněná kapilára, zavedená do atomizátoru jeho dávkovacím otvorem. Po skončení generování je kapilára vyjmuta z atomizátoru a zachycený hydrid je atomizován při teplotách nad 2000 °C [18], [19].

Křemenné atomizátory (QTA) patří v současné době mezi nejpoužívanější. Jsou tvořeny T-trubicí s vodorovným ramenem (optická trubice), umístěným v optické ose spektrometru a přívodním ramenem, kterým je hydrid přiváděn proudem nosného plynu z generátoru (Obr. 1.2). Podle způsobu přivádění kyslíku, nutného pro optimální funkci konvenčního QTA, je možné rozdělení na atomizátory typu plamínek v křemenné trubici (FIT) a na konvenční zevně vyhřívané QTA (EHQTA).



Obr. 1.2 Konvenční křemenný atomizátor

FIT využívá pro přívod kyslíku kapiláru, centrálně umístěnou v přívodním rameni nevyhřívané T-trubice. Na konci kapiláry hoří v přebytku vodíku prakticky neviditelný vodíkovo-kyslíkový difúzní plamínek. V mikroplamínku reakcemi mezi kyslíkem a vodíkem vznikají vodíkové radikály. Tyto radikály tvoří oblak fixovaný na konci kapiláry, ve kterém jsou hydridy atomizovány.

U konvenčních EHQTA atomizátorů je optická trubice zevně vyhřívaná elektricky nebo pomocí plamene acetylen-vzduch na teplotu 700 až 1100 °C. Jako nosný plyn se obvykle používá argon nebo dusík. Na začátku horké zóny atomizátoru je analogicky jako u FIT tvořen oblak vodíkových radikálů reakcemi mezi kyslíkem a vodíkem, vzniklým rozkladem tetrahydridoboritanu. Hydrid je v tomto oblaku atomizován reakcemi s energetickými vodíkovými radikály. Přesná poloha oblaku je dána teplotním profilem uvnitř atomizátoru, průtokem nosného plynu a konstrukcí atomizátoru. Oblak však vyplňuje pouze malou část objemu atomizátoru. Přestože konvenční EHQTA

nevyužívají speciální přívod kyslíku, je jeho jistý obsah v plynech jdoucích do atomizátoru nezbytný pro dosažení optimální citlivosti. Tento kyslíkový nárok je obvykle pokryt stopami kyslíku, které jsou vždy přítomny v roztoku vzorku, v reakčních činidlech a v plynech.

Volné atomy analytu, vznikající v oblaku vodíkových radikálů, jsou unášeny optickou trubicí. Z té mohou mizet dvěma procesy. První proces je mechanický a spočívá v odnosu atomů proudem plynu. Druhý proces, chemický, nastává v důsledku chemických reakcí volných atomů, které jsou mimo oblak nestabilní a začínají reagovat ihned po jeho opuštění. Reakce volných atomů analytu mají za následek jejich nehomogenní rozdělení v podélné ose optické trubice, s největší hustotou kolem spoje přívodního ramene s optickou trubicí [36].

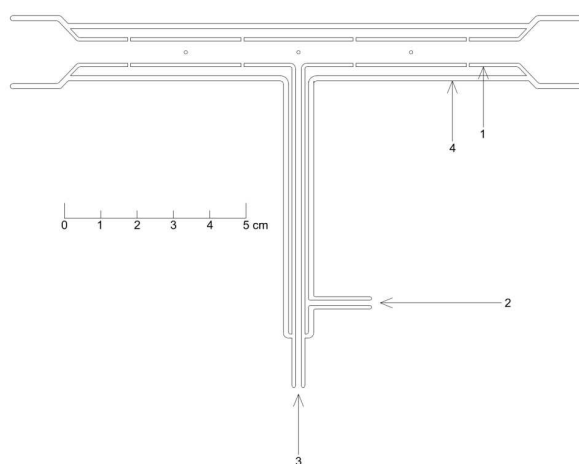
Konvenční QTA umožňují dlouhou dobu setrvání volných atomů analytu v optické cestě spektrometru, což má za následek vysokou citlivost. Také šum je obvykle nízký a je tak možné dosáhnout velmi nízkých detekčních limitů. Nicméně konvenční QTA trpí závažnými nedostatky spočívajícími v nízké odolnosti vůči interferencím, nedostatečnou linearitou kalibračních grafů a špatnou reprodukovatelností citlivosti [37].

Vše je zapříčiněno tím, že volné atomy podléhají chemickým reakcím po opuštění oblaku vodíkových radikálů. Nedostatky konvenčních QTA by mohly být odstraněny, pokud by vodíkové radikály vyplňovaly celou optickou trubicí a analyt by byl udržován ve stavu volných atomů [38].

Nevýhody konvenčních QTA je možné eliminovat použitím multiatomizátoru (Obr. 1.3). Jediný rozdíl mezi těmito atomizátory je dvouplášťové horizontální rameno multiatomizátoru, složené ze dvou koncentrických trubic - vnitřní (optické) a vnější. Vnitřní koncentrická trubice odpovídá optické trubicí konvenčního QTA atomizátoru, ale na rozdíl od ní má po celé délce několik malých otvorů. Do prostoru mezi koncentrickými trubicemi je přiváděn kyslík nebo vzduch, který otvory vstupuje do optické trubice. Na začátku horké zóny je stejným způsobem jako u konvenčního EHQA vytvářen oblak vodíkových radikálů. Další oblaky se objevují v blízkosti každého otvoru, kde dochází k reakci kyslíku s vodíkem. Oproti konvenčnímu EHQA je vodíkovými radikály vyplněna mnohem větší část optické trubice. To má za následek

zlepšení linearity analytických kalibrací a zvýšení odolnosti vůči atomizačním interferencím o jeden až dva řády [36] [39].

Navzdory mnohem lepší výkonnosti multiatomizátoru, oproti konvenčnímu QTA, je stále daleko od ideálu. Odolnost proti interferencím je o dva řády horší ve srovnání s miniaturním difúzním plamenem. To je zřejmě způsobeno tím, že vodíkové radikály nevyplňují celý prostor optické trubice, jako je tomu u miniaturního difúzního plamene [38], [40].



Obr. 1.3 Multiatomizátor; 1 – vnitřní trubice, 2 – vstup pro vzduch nebo kyslík, 3 – vstup nosného plynu s hydridem analytu, 4 – vnější trubice

1.5 Interference

V metodě HG-AAS můžeme pozorovat dva druhy interferencí: spektrální a nespektrální. Spektrální interference jsou způsobené absorpcí záření jinými látkami, než volnými atomy analytu [18].

Jako potenciální spektrální interferenty byly na analytické čáře arsenu (193,7 nm) a selenu (196,0 nm) identifikovány kyslík a voda. Bylo zjištěno, že rozsah těchto interferencí se exponenciálně zvyšuje s teplotou QTA, a tudíž absorpce kyslíkem nebo vodou v optické cestě spektrometru (mimo vyhřívaného optického ramene) nemůže být

zdrojem interferencí, jelikož je absorpce během měřicího cyklu konstantní. Interference jsou způsobeny stopami kyslíku, vstupujícími do vyhřátého optického ramene atomizátoru. Při generování hydridů v uspořádání FIA reaguje kyslík s přebytkem vodíku, vzniklým rozkladem tetrahydridoboritanu. Kyslík je z optické cesty odstraněn přeměnou na vodní páru. V optické cestě tedy není přítomen žádný molekulární kyslík a koncentrace malého množství vodní páry je během měřicího cyklu konstantní. Interference způsobené kyslíkem a vodou mohou být tedy pro tento způsob generování snadno kompenzovány [41].

Také díky tomu, že při generování hydridů dochází k separaci analytu od matrice, nejsou spektrální interference v HG-AAS závažným problémem [42] [42].

K nespektrálním interferencím může docházet v kapalně nebo v plynné fázi. Rozsah interferencí nezávisí na koncentraci analytu, ale pouze na koncentraci interferentu. Interference v kapalně fázi mohou nastávat během vzniku hydridu nebo při jeho transportu z roztoku. Příčinou jsou změny v rychlosti uvolnění hydridu a/nebo snížení účinnosti jeho uvolnění [43]. Zdrojem interferencí může být matrice nebo rozpuštěné organické a anorganické látky. Rozpuštěné anorganické látky patří mezi nejčastější interferenty. Především jsou to silné oxidanty, ionty přechodných a vzácných kovů a ostatní hydridotvorné prvky. Silné oxidanty ruší uvolnění hydridů arsenu, antimonu a selenu. Mechanismus jejich působení spočívá v oxidaci analytu na formu s nejvyšším oxidačním číslem, která není redukována na hydrid vůbec (Se^{VI}) nebo pomaleji (As^{V} , Sb^{V}).

Interference v plynné fázi jsou obvykle způsobeny těkavými látkami, nejčastěji hydridy nebo sprejem transportovaným z generátoru hydridů. Reakcemi volných atomů analytu s interferentem dochází ke snížení populace volných atomů v atomizátoru, a tedy ke snížení pozorovaného signálu. Rozsah interferencí závisí na typu použitého atomizátoru. Interference lze eliminovat separací interferentu před generováním, zředěním vzorku, zvýšením průtoku nosného plynu nebo volbou atomizátoru [18].

1.6 Speciační analýza

Termín speciační analýza byl definován v roce 1982 jako stanovení koncentrací jednotlivých fyzikálně-chemických forem prvku, jejichž součet tvoří celkovou koncentraci prvku ve vzorku [44].

Podle platné definice IUPAC se speciační analýzou rozumí analytické aktivity směřující k identifikaci nebo ke stanovení jedné nebo více jednotlivých chemických specií ve vzorku. Chemická specie je specifická forma prvku definovaná izotopickým složením, elektronickým nebo oxidačním stavem, případně strukturou komplexu nebo molekuly [45].

Generování hydridů je pro speciační analýzu velmi užitečné a může pro ni být využito třemi přístupy:

- selektivní generování hydridů
- generování substituovaných hydridů
- postkolonové generování hydridů

1.6.1 Selektivní generování hydridů

Tento přístup můžeme charakterizovat schématem:

generování hydridu → atomizace/detekce

Speciační analýza je zde založena na odlišné účinnosti převodu jednotlivých forem analytu na hydrid. Účinnost konverze závisí na reakčních podmínkách, jako je rychlost přívodu tetrahydridoboritanu, provedení generátoru, pH atd. Tento přístup se nejčastěji používá pro speciační analýzu anorganických forem arsenu, antimonu, selenu a teluru ve vodných roztocích: $\text{Sb}^{\text{III}}-\text{Sb}^{\text{V}}$, $\text{As}^{\text{III}}-\text{As}^{\text{V}}$, $\text{Se}^{\text{IV}}-\text{Se}^{\text{VI}}$, $\text{Te}^{\text{IV}}-\text{Te}^{\text{VI}}$. V ideálním případě by se generoval hydrid z analytu s nižším oxidačním číslem v jednom alikvótu a z analytu s vyšším oxidačním číslem ve druhém alikvótu. Ve skutečnosti však neexistuje způsob, kterým by se toho docílilo. Typický postup je založen na generování hydridu pouze z analytu s nižším oxidačním číslem v jednom alikvótu a na generování hydridu z obou forem v alikvótu druhém. Generování hydridu z obou forem lze zajistit

předredukci formy s vyšším oxidačním číslem nebo vhodnou volbou podmínek generování. Zastoupení formy s vyšším oxidačním číslem je dáno rozdílem obou alikvótů. V optimálním případě jsou citlivosti obou forem v druhém alikvótu i citlivost formy s nižším oxidačním číslem v alikvótu prvním stejné. Pak lze použít "single species standardization" přístup. To znamená, že stačí změřit signál standardu jen jedné formy v jednom alikvótu. To dramaticky zjednodušuje měření, kromě toho není třeba pracovat se standardy (často) nestabilních forem [19].

V praxi se využívá selektivní generování hydridů v závislosti na pH reakční směsi. Například u arsenu tak lze řídit účinnost generování hydridu z trojmocných a pětímocných forem analytu. Tento přístup využívá výhody toho, že generování arsanů z protonované sloučeniny v nedisociované formě je značně zvýšeno a že hodnoty disociačních konstant pro trojmocné a pětímocné formy arsenu jsou výrazně odlišné. Při nízkém pH (pH 1) jsou generovány hydridy z trojmocných i pětímocných forem arsenu, zatímco při pH 6 se bude generovat hydrid pouze z formy trojmocné, protože pětímocné formy jsou v roztoku disociovány. Problémem tohoto přístupu však je, že nelze generovat hydridy z trojmocných a pětímocných forem se stejnou účinností, a tudíž nelze použít "single species standardization" přístup [46].

Alternativním způsobem je selektivní generování hydridů s použitím předredukčního činidla. Běžně se pro redukci pětímocných forem arsenu používá jodid draselný, obvykle v kombinaci s kyselinou askorbovou nebo také s velmi koncentrovanou HCl (5–10 mol l⁻¹) [47]. Nevýhodou tohoto činidla je nízká stabilita a také nutnost použít vysoké koncentrace HCl a jodidu, aby došlo ke kompletní předredukci analytu [48]. V současné době se jako předredukční činidla nejčastěji používají sloučeniny obsahující thiolovou skupinu, zejména L-cystein [48], [49] a kyselina thioglykolová [50].

Při použití L-cysteinu je možné dosáhnout stejné citlivosti pro všechny anorganické i methylované formy arsenu, avšak největší účinnosti je dosaženo pouze ve velmi úzkém rozsahu koncentrace HCl (0,01 – 0,1 mol l⁻¹). Z tohoto důvodu je vhodnější použít jako reakčního média TRIS pufr [50].

1.6.2 Generování substituovaných hydridů

Tento přístup můžeme charakterizovat schématem:

generování směsi alkyl substituovaných hydridů → separace → atomizace/detekce

Speciační analýza založená na generování substituovaných hydridů je použitelná, pokud mohou být jednotlivé formy analytu převedeny na různé alkyl substituované hydridy. Typickou aplikací je speciační analýza iontových alkyl sloučenin typu $R_nA^{+(m-n)}$, kde m je valence analytu A, hodnota n je mezi 1 a (m-1) a R je alkyl substituent. Výsledkem generování je směs alkyl substituovaných hydridů se sumárním vzorcem $R_nAH_{(m-n)}$, s příslušným binárním hydridem AH_m . Směs je separována a zjištěné zastoupení jednotlivých hydridů udává zastoupení analyzovaných forem analytu.

Tento přístup je možné použít pro speciační analýzu methyl substituovaných forem arsenu, antimonu a germania, methyl a buthyl substituovaných forem cínu a pro analýzu methyl, ethyl a buthyl substituovaných forem olova [19], [20].

1.6.3 Postkolonové generování hydridů

je charakterizováno schématem:

separace → generování hydridu → atomizace/detekce

Tento přístup je koncepčně stejný jako „hyphenated“ speciační analýza, založená na on-line spojení separační a detekční jednotky. Generování hydridů je zde zařazeno pro své hlavní výhody, kterými jsou zvýšení citlivosti a potlačení interferencí při atomizaci [19], [20].

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Používané pracovní roztoky iAs^{III} o požadované koncentraci byly připraveny přesným ředěním ze standardního roztoku iAs^{III} o koncentraci 1000 mg l^{-1} . Tento roztok byl připraven rozpuštěním $0,0660 \text{ g}$ oxidu arsenitého (As_2O_3 ; $M_r = 198$; Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR) v $0,5 \text{ ml}$ 10% roztoku KOH (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR) a doplněním na výsledný objem 50 ml .

Pracovní roztoky iAs^V o požadované koncentraci byly připraveny přesným ředěním ze standardního roztoku iAs^V o koncentraci 1000 mg l^{-1} , připraveného z oxidu arseničného rozpuštěného v roztoku HNO_3 o koncentraci $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Germany).

Pracovní roztok Se o požadované koncentraci byl připraven přesným ředěním ze standardního roztoku Se^{IV} o koncentraci 1000 mg l^{-1} (SeO_2 v $0,5 \text{ mol l}^{-1} HNO_3$), (Merck, Darmstadt, Germany).

Jako redukční činidlo pro chemické generování hydridů byl použit roztok $NaBH_4$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) v $0,1\%$ (m/v) roztoku KOH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Pokud není uvedeno jinak, koncentrace $NaBH_4$ byla $1,0 \%$ (m/v).

Roztok $NaBH_4$ byl připravován vždy čerstvý. Obsah $NaBH_4$ byl stanoven volumetricky, jímáním vodíku do odměrného válce naplněného vodou. Výsledná hodnota byla 92% .

Jako reakční médium byl použit roztok $0,75 \text{ mol l}^{-1}$ TRIS pufru nebo roztok HCl o koncentraci 2 mol l^{-1} . Roztok pufru byl připraven rozpuštěním $29,5500 \text{ g}$ Trizma hydrochloridu ($NH_2C(CH_2OH)_3.HCl$; $M_r = 157,6$; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a doplněním na výsledný objem 250 ml . pH pufru bylo upraveno pomocí 10% roztoku KOH na hodnotu 6. Roztok HCl byl připraven ředěním z 37% HCl čistoty p.a. (Merck, Darmstadt, Germany).

Pro redukci pětimocných forem arsenu byl použit L-cystein hydrochlorid monohydrát ($C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$; $M_r = 176$; Merck, Darmstadt, Germany).

Pro čištění atomizátoru byla použita kyselina fluorovodíková čistota „pro polovodiče“ (Lachema, Brno, ČR) a kyselina dusičná 65% (čistá, Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)

Sušicí trubice byla naplněna NaOH p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR).

Pro přípravu všech roztoků a k mytí laboratorního skla byla použita deionizovaná voda připravená přístrojem Watrex Ultrapur (Watrex, USA).

Při přípravě standardů iAs^{III} pro kalibraci byla deionizovaná voda nejprve sycena dusíkem po dobu 30 minut, aby se zabránilo oxidaci na iAs^V rozpuštěným kyslíkem v roztoku.

Při práci byl používán argon čistoty 99,996 % (SIAD, Praha, ČR), kyslík čistoty 99,99 % (SIAD, Praha, ČR) a vodík čistoty 99,95 % (SIAD, Praha, ČR)

2.2 Instrumentace

Při práci byly používány následující přístroje:

2.2.1 Atomový absorpční spektrometr Perkin-Elmer 503 bez korekce pozadí

Jako detektor je v tomto spektrometru použit fotonásobič. Analogový signál ze spektrometru byl pomocí A/D převodníku zpracováván v počítači na digitální signál a ukládán v podobě txt souborů.

Použité zdroje záření jsou uvedeny v Tab. 2.1. Pokud není uvedeno jinak, platí zdroje záření pro arsen.

Tab. 2.1.: Použité zdroje záření - Perkin-Elmer 503

zdroj záření	označení	napájecí proud mA
bezelektrodová výbojka (Perkin Elmer Systém 2)	Part No. N305-0605	400

zdroj záření	označení	napájecí proud mA
výbojka s dutou katodou (Photron)	P803 s.n. HHE0711	9
Superlampa (Photron)	P803S s.n. 02143	25/18 ^a
Se bezelektrodová výbojka	Part No. N305-0672	280

a – proud superlampy

V základním nastavení byla použita vlnová délka 193,7 nm a šířka spektrálního intervalu 0,7 nm. Za základní nastavení je považováno nastavení pro stanovení arsenu doporučené výrobcem spektrometru. Při stanovení přívodu vodíku do atomizátoru byly použity bezelektrodové výbojky pro arsen a selen. Pro měření se selenem byla použita vlnová délka 196,0 nm a šířka spektrálního intervalu 0,7 nm. Pro měření s arsenem bylo použito základní nastavení popsané výše.

2.2.2 Atomový absorpční spektrometr Perkin-Elmer Aanalyst 800 s deuteriovou korekcí pozadí

Tento spektrometr je vybaven „solid state“ detektorem. Spektrometr byl ovládán pomocí softwaru Aawinlab 4.1, Perkin Elmer instruments LLC. Tento software převádí digitální záznam signálu do txt souborů.

Použité zdroje záření jsou uvedeny v Tab. 2.2.

Tab. 2.2.: Použité zdroje záření - Perkin-Elmer Aanalyst 800

zdroj záření	označení	napájecí proud mA
bezelektrodová výbojka (Perkin Elmer Systém 2)	Part No. N3050605	380
výbojka s dutou katodou (Photron)	P803 s.n. HHE0711	9
superlampa (Photron)	P803S s.n. 02143	22/14 ^a

a – proud superlampy

V základním nastavení byla použita vlnová délka 193,7 nm a šířka spektrálního intervalu 0,7 nm.

2.2.3 Atomový absorpční spektrometr GBC Savantaa

Jako detektor je v tomto spektrometru použit fotonásobič. Spektrometr byl ovládán pomocí softwaru SavantAA verze 3.02b1 (GBC Scientific Equipment, Austrálie). Tento software převádí digitální záznam signálu do txt souborů.

Použité zdroje záření jsou uvedeny v Tab. 2.3.

Tab. 2.3.: Použité zdroje záření GBC Savantaa

zdroj záření	označení	napájecí proud mA
výbojka s dutou katodou (Photron)	P803 s.n. HHE0711	10
superlampa (Photron)	s.n. HHF0436	20/14 ^a

a – proud superlampy

Při posuzování vlivu koncentrace redukčního činidla na generování byla použita vlnová délka 193,7 nm a šířka spektrálního intervalu 2 nm. Pro další měření byla v základním nastavení použita vlnová délka 193,7 nm a šířka spektrálního intervalu 0,7 nm.

Všechna měření byla prováděna bez použití korekce pozadí.

2.3 Aparatury pro generování hydridů

Hydridy byly generovány v uspořádání FIA a v uspořádání CFA. V uspořádání FIA (Obr. 2.1) byl peristaltickým čerpadlem (PP1) čerpán roztok redukčního činidla (1% NaBH₄ v 0,1% KOH), reakčního média (0,75 mol l⁻¹ Tris pufr; 2 mol l⁻¹ HCl) a nosného média (deionizovaná voda). Roztoky byly čerpány tygonovými hadičkami (i.d. 1,02 mm) průtokem 1 ml min⁻¹. Do proudu deionizované vody byl pomocí šesticestného dávkovacího ventilu (DV) (Rheodyne, California, USA) injektován vzorek. Objem dávkovací smyčky byl 250 µl. Roztoky byly smíchány v T-spoji a směs vedena přes reakční cívku do separátoru fází. Reakční cívka byla z teflonu o i.d. 1mm, délce 1 m a objemu 0,79 ml. Za reakční cívku byl hadičkou přiváděn nosný plyn argon průtokem 75 ml min⁻¹. V separátoru fází došlo k oddělení plynné fáze od kapalné. Plynná fáze byla vedena do atomizátoru a kapalná fáze byla čerpána druhým

peristaltickým čerpadlem (PP2) do odpadu. Pro odtah byla použita tygonová hadička (i.d. 1,85 mm).

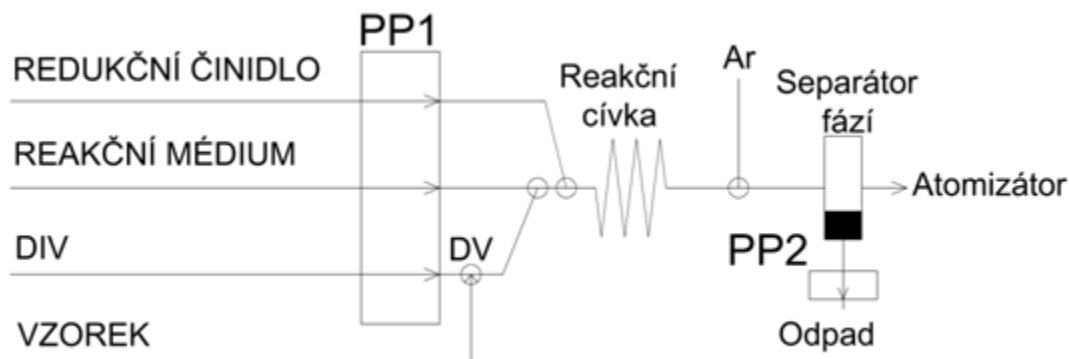
Mezi separátor fází a atomizátor byla v některých experimentech zařazena sušicí trubice, kterou tvořila plastová trubice naplněná pevným NaOH.

Při měření bez reakční cívky byla cívka nahrazena hadičkou o i.d. 1 mm, délce 5 cm a objemu 39 μl .

Veškeré hadičky, kromě čerpacích, byly teflonové o i.d. 0,75 mm. Pouze hadička pro přívod nosného plynu měla i.d. 0,5 mm. T-spoje byly také z teflonu.

Pro čerpání roztoků bylo použito programovatelné čtyřkanálové peristaltické čerpadlo (PP1) Reglo Digital (Ismatec, Switzerland). Pro čerpání odpadu bylo rovněž použito programovatelné čtyřkanálové čerpadlo (PP2) Reglo Digital (Ismatec, Switzerland).

K regulaci průtoku plynů byly použity hmotnostní průtokoměry Omega (Stamford, USA).



Obr. 2.1 Uspořádání FIA; PP1,PP2 – peristaltické čerpadlo, DIV – deionizovaná voda, DV – dávkovací ventil

V uspořádání CFA (Obr. 1.1) byl peristaltickým čerpadlem čerpán roztok redukčního činidla (1% NaBH_4 v 0,1% KOH), reakčního média (0,75 mol l^{-1} Tris pufr; 2 mol l^{-1} HCl) a vzorku. V případě měření slepého pokusu byl vzorek nahrazen

deionizovanou vodou. Roztoky byly vedeny přes reakční cívku do separátoru fází, kde došlo k oddělení plynné fáze od kapalné. Rychlost čerpání roztoků, materiál a průměr hadiček byly totožné jako pro uspořádání FIA.

2.3.1 Separátor fází

Pro oddělení plynné fáze od kapalné byl použit skleněný separátor fází s nuceným odtahem (Obr. 2.2). Celkový objem separátoru byl 2 ml.

Odtahová hadička byla umístěna tak, aby v separátoru neustále zůstával objem asi 0,3 ml. Čerpání odpadu bylo při použití TRIS pufru nastaveno na $9,8 \text{ ml min}^{-1}$. Při použití HCl byl u většiny měření použit také průtok $9,8 \text{ ml min}^{-1}$, v některých případech bylo použito $6,0 \text{ ml min}^{-1}$.

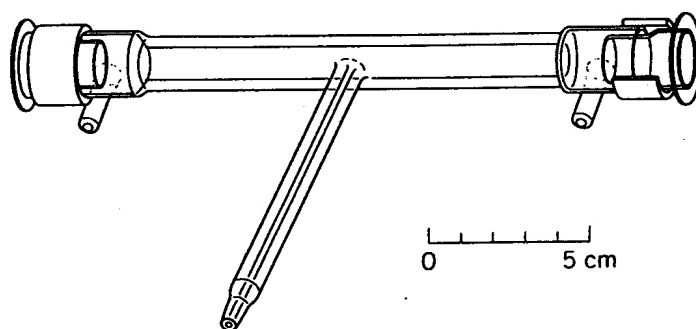


Obr. 2.2 Separátor fází s nuceným odtahem

2.3.2 Atomizátor

K atomizaci byl použit konvenční křemenný atomizátor (Obr. 2.3), zevně vyhříváný na teplotu 900 °C pískou s regulátorem teploty CN63100 (Omega engineering, USA). Atomizátor tvořila T-trubice s horizontálním ramenem o celkové délce 166 mm, vnějším průměru 17 mm a vnitřním průměru optické trubice 9 mm. Délka přívodního ramene byla 90 mm s i.d. 1 mm. Křemenná okénka ukázaná na Obr. 2.3 nebyla pro popisované experimenty nasazena.

Při poklesu citlivosti byl atomizátor vyčištěn ve směsi kyseliny fluorovodíkové a kyseliny dusičné v poměru 3:7 po dobu 10 minut.



Obr. 2.3 Používaný EHQTA

2.4 Popis experimentů

Hydridy byly generovány ve dvou uspořádáních. Pro měření v uspořádání FIA byl použit hydridový generátor znázorněný na Obr. 2.1. Příslušné roztoky byly čerpány peristaltickým čerpadlem. Dávkovací ventil byl otočen do polohy „fill“ a pomocí injekční stříkačky byla dávkovací smyčka plněna vzorkem. Po spuštění záznamu signálu byl ventil otočen do polohy „inject“ a do proudu nosiče byl injektován vzorek. Záznam byl ukončen po vrácení signálu na základní linii. Výsledný záznam měl tvar píku a byla vyhodnocena jeho plocha a výška pomocí programu Microsoft Excel.

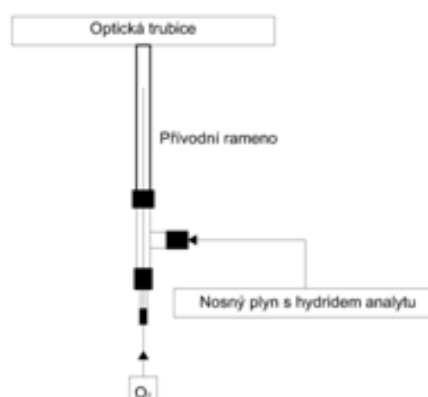
Pro měření v uspořádání CFA byl použit hydridový generátor znázorněný na Obr. 1.1. Při měření bylo střídáno nasávání vzorku a deionizované vody. Nejprve byla nasávána deionizovaná voda. Po spuštění záznamu signálu bylo vyčkáno 10 s a poté byl nasáván vzorek. Po dosažení ustáleného stavu byla opět nasávána deionizovaná voda a po vrácení signálu na základní linii byl záznam ukončen. Výška signálu byla vyhodnocena jako výškový rozdíl mezi signálem vzorku v ustáleném stavu a signálem slepého vzorku.

Pokud bylo ke vzorku standardu přidáno redukčního činidlo, L-cystein, bylo před měřením vyčkáno 1 h, aby předredukce proběhla kvantitativně. Standard byl připraven tak, aby obsahoval 2 % L-cysteinu (m/v).

Průtok redukčního činidla, reakčního média a nosného média byl vždy 1 ml min^{-1} . Průtok nosného plynu byl u každého měření 75 ml min^{-1} . Koncentrace reakčního média – HCl byla vždy 2 mol l^{-1} a koncentrace TRIS pufru byla vždy $0,75 \text{ mol l}^{-1}$ (pH = 6). Kromě měření prováděných v podkapitole 3.1, byla koncentrace redukčního činidla vždy 1,0 %.

2.4.1 Perkin Elmer 503

Na tomto přístroji bylo stanovováno množství vodíku vzniklého rozkladem tetrahydridoboritanu sodného. Pro stanovení byly použity dva přístupy. U obou přístupů byl kapilárou o i.d. 0,53 mm (Supelco, Německo), umístěnou v přívodním rameni, přiváděn kyslík (Obr.2.5). Kapilára byla umístěna 3 cm před optickou cestu.



Obr. 2.4 Přívod kyslíku kapilárou do atomizátoru

První přístup: „titrace“ vodíku kyslíkem – indikace nespecifickou absorpcí kyslíku

- nejprve bylo spuštěno generování. Jako reakční médium byla použita HCl o koncentraci 2 mol l^{-1} a koncentrace redukčního činidla NaBH_4 byla 1 %. Kanálem pro vzorek byla čerpána deionizovaná voda. Kapilárou, umístěnou v přívodním rameni atomizátoru, byl přiváděn kyslík. Po spuštění záznamu signálu byl průtok kyslíku 0 ml min^{-1} . Po chvíli byl průtok kyslíku zvýšen a po dosažení ustáleného stavu byl průtok opět nastaven na 0 ml min^{-1} . Průtok kyslíku byl v jednotlivých měřeních postupně zvyšován v rozmezí $2\text{-}30 \text{ ml min}^{-1}$. Byla vyhodnocena výška signálu v ustáleném stavu.

Druhý přístup: „titrace“ vodíku kyslíkem – indikace detekcí volných atomů analytu

- u tohoto přístupu bylo použito uspořádání FIA a CFA. Jako reakční médium byla použita HCl o koncentraci 2 mol l^{-1} a jako redukční činidlo NaBH_4 o koncentraci 1 %. Kyslík byl přiváděn kapilárou, umístěnou v přívodním rameni atomizátoru. Při měření v uspořádání FIA byl průtok kyslíku nejprve

nastaven na určitou hodnotu a poté byl spuštěn záznam signálu. Získaný signál měl tvar píku a byla vyhodnocena jeho plocha. V uspořádání CFA byl průtok kyslíku v průběhu jednoho měření postupně zvyšován v rozmezí 0 – 15 ml min⁻¹.

Dále byl na tomto spektrometru kvantifikován šum základní linie spektrometru pro různé parametry atomizátoru a spektrometru a měřeny kalibrační závislosti. K měření byly použity tři zdroje záření (viz. 2.2). Kalibrační závislosti byly měřeny v uspořádání FIA i CFA. Mezi separátor a atomizátor byla zařazena sušicí trubice. Délka měření v uspořádání FIA byla 80 s a v uspořádání CFA 350 s. Absorbance byla odečítána 25krát za sekundu.

2.4.2 Perkin Elmer Aanalyst 800

Na tomto přístroji byl kvantifikován šum základní linie spektrometru pro různé parametry atomizátoru a spektrometru a měřeny kalibrační závislosti. K měření byly použity tři zdroje záření (viz 2.2). Pro měření kalibračních závislostí bylo použito pouze uspořádání FIA, jelikož software přístroje neumožňoval měření v časovém intervalu delším než 58 s. Mezi separátor a atomizátor byla zařazena sušicí trubice. Absorbance byla odečítána 101krát za sekundu a celkový počet odečtených bodů v jednom měření byl 5854.

2.4.3 GBC Savanta

Tento spektrometr byl využit pro měření vlivu koncentrace redukčního činidla na generování, pro kvantifikaci šumu základní linie spektrometru pro různé parametry atomizátoru a spektrometru a pro měření kalibračních závislostí.

Použité koncentrace redukčního činidla byly 0,05; 0,10; 0,25, 0,50, 1,00 a 2,00 %. Pro generování bylo použito uspořádání FIA. Délka záznamů byla 60 s. Získané signály měly tvar píku a byla vyhodnocena jejich plocha. Koncentrace použitých standardů iAs^{III} a iAs^V byla 40 µg l⁻¹. V jednom experimentu byla reakční cívka nahrazena hadičkou, jejíž rozměry jsou uvedeny v podkapitole 2.3.

Vodík byl přiváděn za reakční cívkou průtokem 10 ml min^{-1} .

Pro kvantifikaci šumu základní linie spektrometru a měření kalibračních závislostí byly použity dva zdroje záření (viz 2.2). Kalibrační závislosti byly měřeny v uspořádání FIA i CFA. Mezi separátor a atomizátor byla zařazena sušící trubice. Délka měření v uspořádání FIA byla 80 s a v uspořádání CFA 350 s. Absorbance byla odečítána 50krát za sekundu.

2.5 Zpracování naměřených dat

2.5.1 Použité počítačové programy

Ke zpracování a vyhodnocení dat byly použity následující programy: Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA), Microsoft Word 2007 (Microsoft Corporation, USA), Aawinlab 4.1 (Perkin Elmer instruments LLC), SavantAA verze 3.02b1 (GBC Scientific Equipment, Austrálie).

2.5.2 Statistické vyhodnocení dat

Z výsledků opakovaného měření byla odhadnuta správná hodnota pomocí aritmetického průměru:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.1)$$

kde n představuje počet provedených paralelních měření sledované veličiny a x_i naměřenou hodnotu sledované veličiny pro v pořadí i -té měření.

Charakteristikou přesnosti výsledků, je směrodatná odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.2)$$

kde n opět představuje počet provedených paralelních měření sledované veličiny a x_i naměřenou hodnotu sledované veličiny pro i -té měření.

Relativní směrodatná odchylka je vyjádřena jako:

$$s_r = \frac{s}{x} \quad (2.3)$$

Mez detekce (LOD) byla stanovena jako trojnásobek směrodatné odchylky naměřených hodnot slepého vzorku vztažený na citlivost:

$$LOD = \frac{3 \cdot s_b}{k} \quad (2.4)$$

kde s_b je směrodatná odchylka, k je směrnice kalibrační přímky.

Mez stanovitelnosti (LOQ) byla stanovena jako desetinásobek směrodatné odchylky naměřených hodnot slepého vzorku vztažený na citlivost:

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_b}{k} \quad (2.5)$$

kde s_b je směrodatná odchylka, k je směrnice kalibrační přímky [51].

Kombinovaná nejistota byla vypočítána podle následujících vztahů:

$$\begin{aligned} x &= f(q, k_1, k_2) \\ k_1 &\pm \sigma_{k1} \\ k_2 &\pm \sigma_{k2} \\ q &\pm \sigma_q \\ x &\pm \varepsilon \\ y_1 &= k_1 \cdot x + q \\ y_2 &= k_2 \cdot x \\ x &= \frac{q}{k_2 - k_1} \\ \varepsilon^2 &= \left(\frac{dx}{dq} \right)^2 \cdot \sigma_q^2 + \left(\frac{dx}{dk_1} \right)^2 \cdot \sigma_{k1}^2 + \left(\frac{dx}{dk_2} \right)^2 \cdot \sigma_{k2}^2 \end{aligned} \quad (2.6)$$

$$\varepsilon^2 = \left(\frac{1}{k_2 - k_1} \right)^2 \cdot \sigma_q^2 + \left(\frac{q}{(k_2 - k_1)^2} \right)^2 \cdot \sigma_{k1}^2 + \left(\frac{q}{(k_1 - k_2)^2} \right)^2 \cdot \sigma_{k2}^2$$

$$\varepsilon = \sqrt{\left(\frac{1}{k_2 - k_1} \right)^2 \cdot \sigma_q^2 + \left(\frac{q}{(k_2 - k_1)^2} \right)^2 \cdot \sigma_{k1}^2 + \left(\frac{q}{(k_1 - k_2)^2} \right)^2 \cdot \sigma_{k2}^2} \quad (2.6)$$

kde x je průsečík přímek (bod na ose x), q je úsek na ose y , k_1 a k_2 jsou směrnice přímky, σ_q , σ_{k1} , σ_{k2} jsou příslušné nejistoty a ε je kombinovaná nejistota.

Pro zjištění plochy píku byly naměřené hodnoty absorbance exportovány do programu Microsoft Excel, kde byly integrovány podle vztahu:

$$I_0 = (1/n) \cdot (t_k - t_z) \cdot \sum_{i=1}^n A_i \quad (2.7)$$

kde I_0 je plocha píku integrovaná od nuly, A_i je i -tá hodnota absorbance, $i=1$ platí pro čas t_z (čas začátku píku), $i=n$ platí pro čas t_k (čas konce píku), n je počet hodnot absorbance

$$n = 25 \cdot (t_k - t_z) + 1 \quad (2.8)$$

Plocha píku byla korigována na základní linii podle vztahu:

$$I_k = I_0 - \frac{(t_k - t_s) \cdot (A_s - A_k)}{2} \quad (2.9)$$

kde I_k je plocha píku korigovaná na základní linii, A_z je průměr ze 125 čtení absorbance (5 s) od času $t_z - 5$ s do času $t_z + 5$ s a A_k je průměr ze 125 čtení absorbance (5 s) od času t_k do času $t_k + 5$ s.

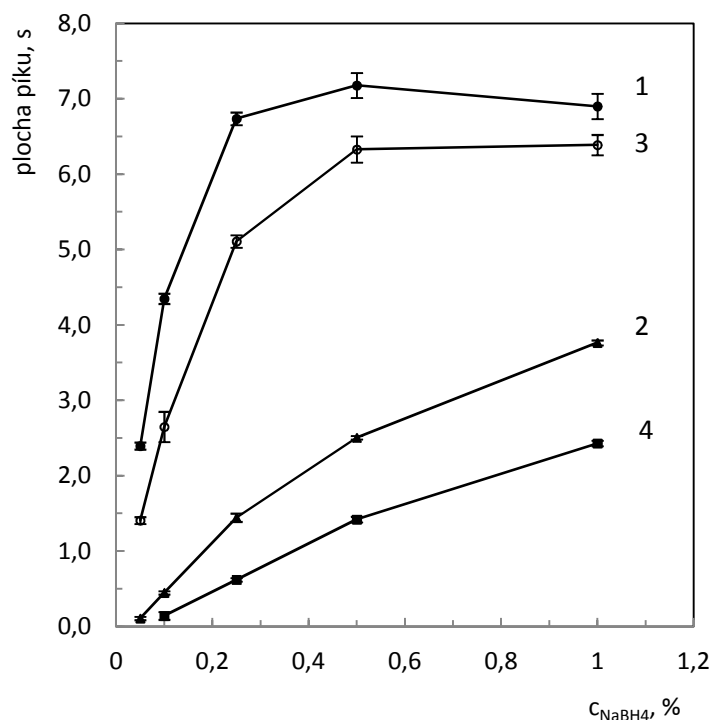
3 Výsledková část a diskuze

Experimenty provedené pro posouzení vlivu koncentrace redukčního činidla na generování arsanu a na pH reakční směsi byly realizovány na spektrometru GBC Savantaa. Jako zdroj záření byla použita superlampa integrovaná v přístroji. Vlnová délka byla nastavena na 193,7 nm a šířka spektrálního intervalu byla 2 nm. Hydridy byly generovány v uspořádání FIA. Koncentrace standardů iAs^{III} a iAs^V byla $40 \mu g l^{-1}$.

Pro stanovení přívodu vodíku do atomizátoru byl použit přístroj Perkin-Elmer 503. Jako zdroj záření byly použity bezelektrodové výbojky pro arsen a selen. V případě arsenu byla použita vlnová délka 193,7 nm a šířka spektrálního intervalu 0,7 nm a při stanovení na analytické čáře selenu byla použita vlnová délka 189,0 nm a šířka štěrbin 0,7 nm. Pro měření bylo použito uspořádání FIA a CFA. Koncentrace standardů iAs^{III} a Se^{IV} byla $40 \mu g l^{-1}$.

Pro kvantifikaci šumu základní linie spektrometru a pro měření kalibračních závislostí byly použity spektrometry Perkin-Elmer 503, Perkin-Elmer Aanalyst 800 a GBC Savantaa. Jako zdroj záření byly u prvních dvou jmenovaných použity EDL, HCL a superlampa. U přístroje GBC Savantaa byla použita HCL a integrovaná superlampa. Kalibrační závislosti byly měřeny v uspořádání FIA a CFA, v případě měření na Perkin-Elmer Aanalyst 800 bylo použito pouze uspořádání FIA. Použité vlnové délky a šířky spektrálních intervalů jsou uvedeny v příslušných tabulkách s výsledky.

3.1 Úvodní experimenty - vliv koncentrace redukčního činidla



Obr. 3.1 Vliv koncentrace NaBH_4 na generování arsanu z iAs^{III} a iAs^{V} v prostředí HCl

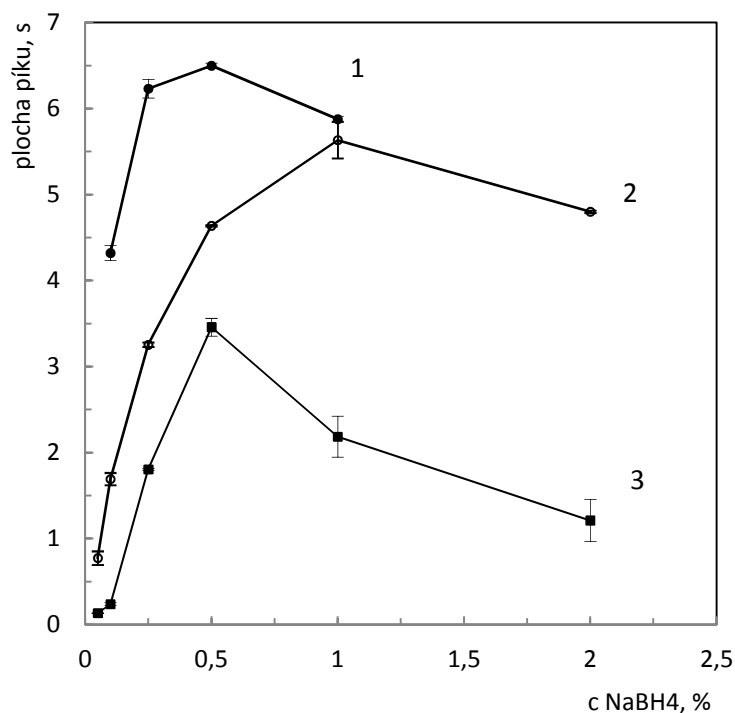
1 - iAs^{III} (s reakční cívkou), 2 - iAs^{V} (s reakční cívkou), 3 - iAs^{III} (bez reakční cívky), 4 - iAs^{V} (bez reakční cívky); $c_{\text{HCl}} = 2 \text{ mol l}^{-1}$, $c_{\text{analytu}} = 40 \mu\text{g l}^{-1}$

Obr. 3.1 ukazuje, že pro "standardní podmínky", t.j. pro generování arsanu z iAs^{III} v prostředí HCl s reakční cívkou, je optimální koncentrace redukčního činidla 0,5 %. Této koncentraci odpovídá maximální signál. Při vyšších koncentracích signál lehce klesá, což lze přičíst na vrub zvýšení přívodu vodíku vzniklého rozkladem redukčního činidla do atomizátoru [36]. Odstranění reakční cívky vede k malému, ale signifikantnímu poklesu citlivosti, což dokazuje, že konverze iAs^{III} na arsan a jeho uvolnění z kapalně fáze nejsou natolik rychlé, aby bylo dosaženo optimální účinnosti generování arsanu pouze ze separátoru fází.

Pro speciální analýzu založenou na selektivním generování hydridů v závislosti na pH reakční směsi (viz 1.6.1) je podstatná i účinnost generování hydridu z pětimocné

formy analytu. Ta je za daných podmínek experimentu, bez ohledu na délku reakční cívky, evidentně nedostatečná (viz Obr. 3.1). To je ve shodě s dříve publikovanými pracemi [18], [52]. Nízká účinnost generování hydridu z pětimocné formy arsenu, kterou podle předchozích zjištění [52] nelze podstatně zlepšit ani vyšší koncentrací HCl, ani koncentrovanějším redukčním činidlem, je pro speciální analýzu komplikujícím faktorem [52]. Důsledkem je, že nelze použít "single species standardization" přístup (viz 1.6.1).

Proto byly zkoumány signály odpovídající podmínkám speciální analýzy založené na selektivním generování hydridů s použitím předredukčního činidla L-cysteinu. Obr. 3.2 ukazuje vliv koncentrace redukčního činidla na signál nepředredukovaného vzorku iAs^{III} v prostředí TRIS pufru (v tomto prostředí je signál iAs^V zanedbatelný). Literární zdroje přesvědčivě dokládají, že v přítomnosti L-cysteinu nelze arsan účinně generovat ze silně kyselých prostředí, odpovídajících koncentraci HCl nad $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ [46], [53]. Proto bylo, ve shodě s běžnou praxí [46], prostředí TRIS pufru použito i pro vzorky předredukované L-cysteinem, kdy za těchto podmínek jsou signály obou forem identické. Pro srovnání byla paralelně s těmito měřeními znovu změřena analogická závislost pro iAs^{III} v prostředí HCl.



Obr. 3.2 Vliv koncentrace NaBH₄ na generování arsanu z iAs^{III} v prostředí HCl a TRIS pufru; 1 - iAs^{III}, HCl; 2 - iAs^{III}, TRIS pufr; 3 - iAs^{III} + 2% L-cystein, TRIS pufr; $c_{\text{HCl}} = 2 \text{ mol l}^{-1}$, $c_{\text{TRIS pufr}} = 0,75 \text{ mol l}^{-1}$, $\text{pH} = 6$; $c_{\text{analytu}} = 40 \mu\text{g l}^{-1}$

Z Obr. 3.2 vyplývá, že na rozdíl od prostředí kyseliny chlorovodíkové, kdy je optimální koncentrace redukčního činidla 0,5 %, v prostředí TRIS pufru je optimální koncentrace NaBH₄ 1%. Kromě toho účinnost generování hydridu pro suboptimální koncentrace NaBH₄ je v tomto případě podstatně nižší, než z prostředí kyseliny chlorovodíkové. Tyto rozdíly nejsou snadno vysvětlitelné, avšak pro speciální analýzu založenou na selektivním generování hydridů nejsou podstatné, protože v tomto případě je důležité pouze srovnání signálů s a bez předredukce, změřených v prostředí TRIS pufru. Obr. 3.2 ilustruje v tomto ohledu neuspokojivou situaci. Nejen, že maximální signál předredukovaného vzorku je významně nižší než bez předredukce (nebo než v prostředí HCl), ale dokonce vliv koncentrace redukčního činidla na signály s a bez předredukce vykazuje v celém zkoumaném rozsahu odlišný charakter. Proto "single species standardization" přístup nelze použít ani v případě použití předredukčního činidla L-cysteinu.

Řada provedených měření, ilustrovaných na Obr. 3.1 a Obr. 3.2 i dalších, přesvědčivě dokazuje, že testované experimentální uspořádání, založené na generátoru hybridů kompatibilním s maximální průchodností vzorků – t.j. s miniaturním separátorem fází, neumožňuje bez další optimalizace použít "single species standardization" přístup pro speciální analýzu založenou na selektivním generování hybridů.

Toto zjištění bylo impulzem pro zahájení projektu cíleného na optimalizaci parametrů speciální analýzy založené na selektivním generování hybridů v uspořádání přímého přenosu hybridů a on-line atomizace v atomovém absorpčním spektrometru.

Experimenty provedené v rámci předkládané diplomové práce jsou součástí tohoto projektu. Tyto experimenty lze rozdělit do dvou okruhů. První okruh experimentů měl za cíl přispět k porozumění procesů probíhajících při generování a atomizaci hybridů za podmínek speciální analýzy As založené na selektivním generování hybridů s použitím předredukčního činidla L-cysteinu. Druhý okruh experimentů pak sloužil k charakterizování vlivu relevantních parametrů atomizátoru a atomových absorpčních spektrometrů na základní analytické charakteristiky stanovení As založeného na generování hybridů.

3.2 Procesy probíhající při generování a atomizaci

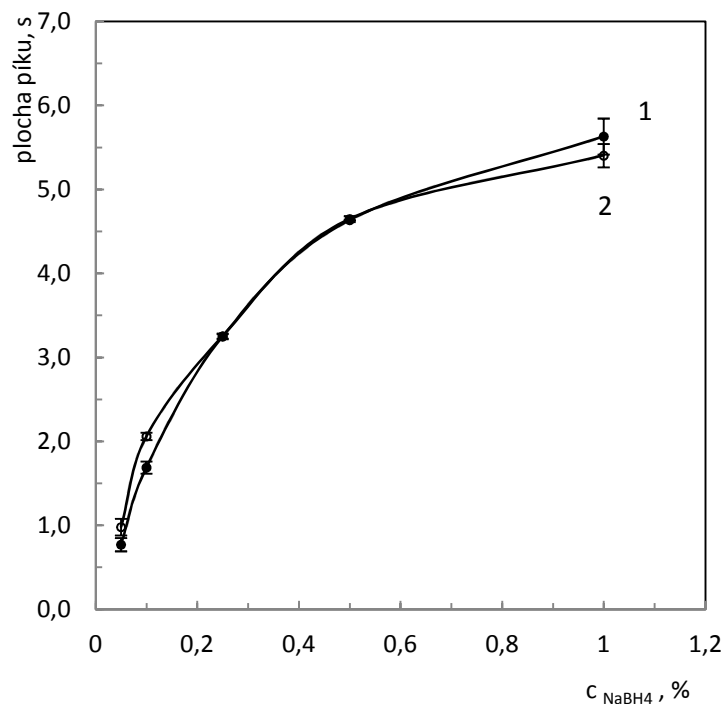
Pozorovaný signál je ovlivněn procesy probíhajícími v generátoru, zvláště pak v separátoru fází a v atomizátoru. Jak je uvedeno v odstavci 1.4.1, v generátoru dochází k postupné hydrolýze tetrahydridoboritanu a analyt je postupně redukován meziprodukty hydrolýzy na hydrid. Oba tyto procesy jsou významně ovlivňovány reakčním prostředím. Jinými slovy, hydrolýza i postupná konverze analytu na hydrid mohou probíhat odlišně v prostředí HCl, TRIS pufru i v prostředí TRIS pufru s L-cysteinem. Situace je komplikována tím, že všechny, nebo alespoň některé reakce probíhají částečně v reakční cívce a částečně v separátoru fází. Navíc, vzhledem k miniaturním rozměrům použitého separátoru fází, k některým reakcím může docházet až po odčerpání reakční směsi do odpadu, což může mít za následek snížení účinnosti generování hydridu. Rozsah tohoto snížení účinnosti generování je ovlivněn kinetikou

všech chemických (hydrolyza a postupná konverze) i fyzikálních (přechod těkavých komponent z kapalné do plynné fáze) procesů, která při dané konstrukci generátoru závisí na reakčním prostředí a na průtoku nosného plynu generátorem. Pro úplnost je nutno dodat, že reakční prostředí je, při daných průtocích reakčních komponent, ovlivněno i koncentrací redukčního činidla. Obr. 3.1 přesvědčivě ilustruje tyto úvahy na případě generování hydridu z pětímocné formy analytu: účinnost je ve srovnání s účinností generování hydridu z trojmocné formy podstatně nižší, protože kinetika konverze analytu na hydrid je u pětímocné formy pomalejší [18]. Použitý generátor hydridů, zahrnující miniaturní separátor fází, proto neposkytuje před odčerpáním reakční směsi do odpadu dostatek času pro postupnou konverzi analytu na hydrid a pro jeho uvolnění do plynné fáze. Tato situace se výrazně zlepšuje se zvyšováním koncentrace redukčního činidla, ale ani maximální použitelná koncentrace redukčního činidla (ani vyšší koncentrace HCl) nestačí ke zvýšení účinnosti generování hydridu na úroveň srovnatelnou s účinností z trojmocné formy.

Pokud jde o procesy probíhající v atomizátoru, pro atomizaci hydridu je nutná přítomnost vodíku v atmosféře atomizátoru. Jinak nejsou volné atomy analytu pozorovány [36]. Vodík je v atomizátoru přítomen jako produkt rozkladu tetrahydridoboritanu (viz 1.4.1). Avšak jeho přívod do atomizátoru je, za dané koncentrace redukčního činidla přiváděného do generátoru a za dané konstrukce generátoru, ovlivněn kinetikou hydrolyzy tetrahydridoboritanu (viz 1.4.1). Ta může být ovlivněna reakčním prostředím v generátoru analogicky jako výše diskutovaná účinnost generování hydridu z pětímocné formy. Hydrolyza tetrahydridoboritanu může z větší či menší části probíhat až po odčerpání reakční směsi do odpadu.

Kvůli posouzení eventuálního vlivu měnící se koncentrace vodíku v atomizátoru na pozorovaný signál byla znovu změřena závislost signálu iAs^{III} v prostředí TRIS pufru na koncentraci redukčního činidla, ale tentokrát i s přidáním 10 ml min^{-1} vodíku. Obr. 3.3 ukazuje, že přidání vodíku nemá na signál v celém zkoumaném rozsahu koncentrací redukčního činidla vliv. To dokazuje, že situace prezentovaná na Obr. 3.1 a Obr. 3.2 reflektuje děje v generátoru, takže změřené závislosti ploch signálů vystihují závislosti účinnosti generování. Z toho vyplývá, že v popsaném experimentálním zařízení a za daných podmínek generování a atomizace, lze ze studia chování ploch

signálů usuzovat přímo na děje odehrávající se při generování a že procesy probíhající při atomizaci není třeba brát v úvahu.



Obr. 3.3 Vliv koncentrace NaBH_4 na generování arsanu z iAs^{III} , přidání H_2 ; 1 - iAs^{III} , *TRIS pufr*; 2 - iAs^{III} , *TRIS pufr, H_2* ; $c_{\text{analytu}} = 40 \mu\text{g l}^{-1}$, $c_{\text{HCl}} = 2 \text{ mol l}^{-1}$, $v_{\text{H}_2} = 10 \text{ ml min}^{-1}$

3.2.1 Vliv pH reakční směsi

Jak je diskutováno výše, pro speciální analýzu založenou na selektivním generování hydridů je směrodatné srovnání signálů změřených v prostředí *TRIS* pufru bez předredukce se signály změřenými po předredukci *L*-cysteinem. Cílem následujících měření bylo přispět k vysvětlení neuspokojivé situace ilustrované na Obr. 3.2 (odlišný charakter vlivu koncentrace redukčního činidla na signály s a bez předredukce).

Při generování arsanu z iAs^{III} v prostředí *HCl*, vzhledem k výraznému stechiometrickému nadbytku *HCl* nad tetrahydridoboritanem, pH reakční směsi (měřené na skončení reakce) na koncentraci redukčního činidla příliš nezávisí (viz Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Vliv koncentrace NaBH_4 na pH zreagované směsi při použití reakčních médií HCl a TRIS pufru; c - koncentrace NaBH_4 v % (m/v)

	TRIS pufr		HCl
c	pH^a	pH^b	pH
2,00	-	7,23	0,55
1,00	7,16	6,28	0,57
0,50	6,87	6,13	0,58
0,25	6,64	2,40	0,56
0,10	6,47	1,90	0,55
0,05	6,35	1,85	0,54

a – bez předredukce, b – s předredukcí ve 2% L-cysteinu

Analogicky se u nepředredukovaných vzorků při generování v prostředí TRIS pufru pH v celém rozsahu koncentrací redukčního činidla příliš nemění (Tab. 3.1).

Situace je však dramaticky odlišná u předredukovaných vzorků (generování v prostředí TRIS pufru). Jak je zaznamenáno v Tab. 3.1, pH reakční směsi výrazně závisí na koncentraci redukčního činidla. Dochází k výraznému snížení pH, zejména při použití nižších koncentrací. O mechanismu postupné hydrolýzy tetrahydridoboritanu a o postupné redukci analytu meziprodukty hydrolýzy na hydrid existuje v literatuře [30], [31] dost podrobností, avšak o vlivu pH v přítomnosti L-cysteinu na tvorbu arsanu podrobné informace schází. Známým faktem pouze je, že v přítomnosti L-cysteinu je pH (eventuálně koncentrace kyseliny přiváděné do generátoru) určujícím faktorem a že závislost účinnosti generování arsanu na pH je komplikovaná [46]. Avšak odlišný

charakter závislosti účinnosti generování arsanu na koncentraci redukčního činidla v prostředí TRIS pufru s a bez předredukce L-cysteinem (Obr. 3.2) nelze vysvětlit pouze odlišným pH. Dokazuje to výrazný pokles účinnosti generování z předredukovaných vzorků při zvýšení koncentrace redukčního činidla z 0,5 na 1 %, ačkoliv pH se pro tyto koncentrace redukčního činidla prakticky neliší (Tab. 3.1) To nasvědčuje tomu, že koncentrace redukčního činidla, koncentrace L-cysteinu a koncentrace (a typ pufru) spoluovlivňují účinnost generování arsanu. Z toho vyplývá, že dříve pozorované [46] shodné účinnosti generování arsanu pro vzorky s a bez předredukce v prostředí TRIS pufru bylo dosaženo při použití generátoru hydridů s objemným separátorem fází provozovaným v diskontinuálním režimu poskytujícím dostatek času pro postupnou konverzi analytu na hydrid a pro jeho uvolnění do plynné fáze [46].

Výše uvedená fakta, především spolupůsobení redukčního činidla, předredukčního činidla, pH a konstrukce generátoru a separátoru frází, vedou k závěru, že k poznání procesů probíhajících při generování arsanu bude potřeba rozsáhlých studií, které přesahují možnosti předkládané diplomové práce, a proto budou předmětem dalších zkoumání. Tato práce se soustředila pouze na jeden aspekt procesů probíhajících při generování: na stanovení množství vodíku přicházejícího do atomizátoru za různých podmínek generování.

3.2.2 Vývoj metody stanovení přívodu vodíku do atomizátoru

Jak je uvedeno výše (viz 1.4.1), při každé ze čtyř následných hydrolytických reakcí, kterými probíhá konverze tetrahydridoboritanu na kyselinu boritou, se uvolňuje molekulární vodík. Jak vyplývá ze stechiometrie (viz 1.4.1), z 1 g tetrahydridoboritanu sodného vznikne asi 2,4 litru vodíku. To samozřejmě platí pro kompletní hydrolýzu. V závislosti na reakčních podmínkách může být hydrolýza dokončena až po odčerpání reakční směsi do odpadu, což má za následek snížení množství vodíku transportované do atomizátoru. Množství vodíku transportované do atomizátoru je velmi důležitým indikátorem reakcí probíhajících v generátoru, protože je mírou účinnosti využití tetrahydridoboritanu přivedeného do generátoru pro konverzi analytu na hydrid a pro uvolnění hydridu do plynné fáze (vzniklý vodík uvolňuje vznikající hydrid do plynné fáze).

Přímé měření průtoku plynu ze separátoru fází do atomizátoru digitálním průtokoměrem je nepoužitelné, protože celkový průtok plynů je ovlivněn (prakticky nezjistitelnou) frakcí nosného argonu odtahovanou do odpadu.

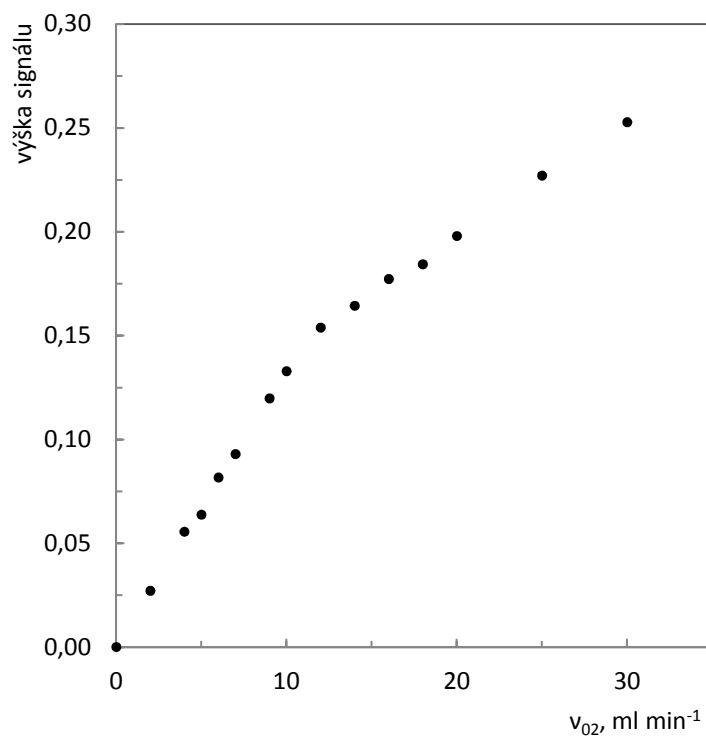
Vzhledem k tomu, že z výše uvedených důvodů bylo nutné stanovit množství vodíku, který přichází do atomizátoru, byly v rámci této práce vyvinuty dva zcela nové, v literatuře dosud nepopsané, přístupy. Oba tyto přístupy jsou založené na "titraci" vodíku produkovaného v generátoru kyslíkem přiváděným do atomizátoru. Modifikace aparatury používané pro tyto titrace jsou popsány v experimentální části (viz 2.4.1)

Tyto přístupy se od sebe liší způsobem indikace bodu stechiometrie - t.j. průtoku kyslíku, který je dle stechiometrie reakce vodíku s kyslíkem roven polovičnímu průtoku vodíku. První přístup je založen na sledování nespecifické absorpce kyslíku. Druhý přístup je založen na známém faktu, že pro atomizaci hydridu je nutná přítomnost vodíku v atmosféře atomizátoru. Jinak nejsou volné atomy analytu pozorovány [18], [36].

Prvním úkolem bylo vyhodnotit analytické parametry obou přístupů. Pro tento úkol byly srovnávány oba přístupy ke stanovení průtoku vodíku do atomizátoru pro "standardní podmínky" generování v prostředí HCl s koncentrací redukčního činidla 1 % (viz. 2.4.1).

3.2.3 „Titrace“ vodíku kyslíkem – indikace nespecifickou absorpcí kyslíku

U tohoto přístupu byla měřena závislost výšky signálu neselektivní absorpce na průtoku kyslíku přiváděného kapilárou do atomizátoru. Po spotřebování veškerého vodíku dochází ke značenému zvýšení signálu, způsobené výraznou nespecifickou absorpcí kyslíku. Před bodem stechiometrie se uplatňovala pouze nespecifická absorpce vody. Průběh závislosti měřené na analytické čáře arsenu je znázorněn na Obr. 3.4.



Obr. 3.4 Závislost výšky signálu na průtoku kyslíku

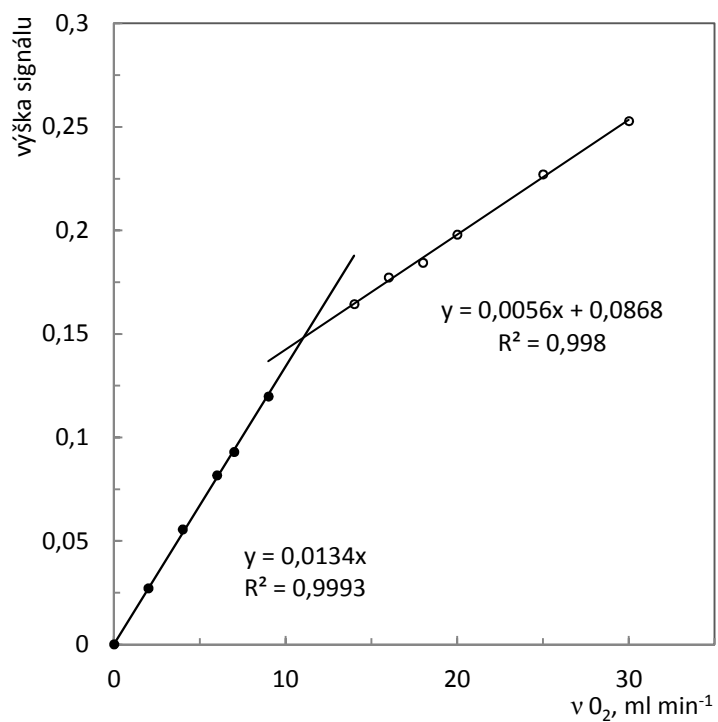
$$c_{NaBH_4} = 1,00 \%, c_{HCl} = 2 \text{ mol } l^{-1}$$

Hodnota průtoku kyslíku v bodě stechiometrie byla získána proložením závislosti dvěma přímkami a výpočtem společného bodu na ose x (průsečíku) z regresních rovnic těchto přímek (Obr. 3.5).

$$y_1 = k_1 \cdot x + q$$

$$y_2 = k_2 \cdot x$$

$$y_1 = y_2 \Rightarrow x = \frac{q}{k_2 - k_1}$$



Obr. 3.5 Vyhodnocení průtoku kyslíku v bodě stechiometrie

V Tab. 3.2 jsou uvedeny výsledné hodnoty průtoků kyslíku a jejich nejistoty. Průtoky vodíku jsou dle stechiometrie dvojnásobné.

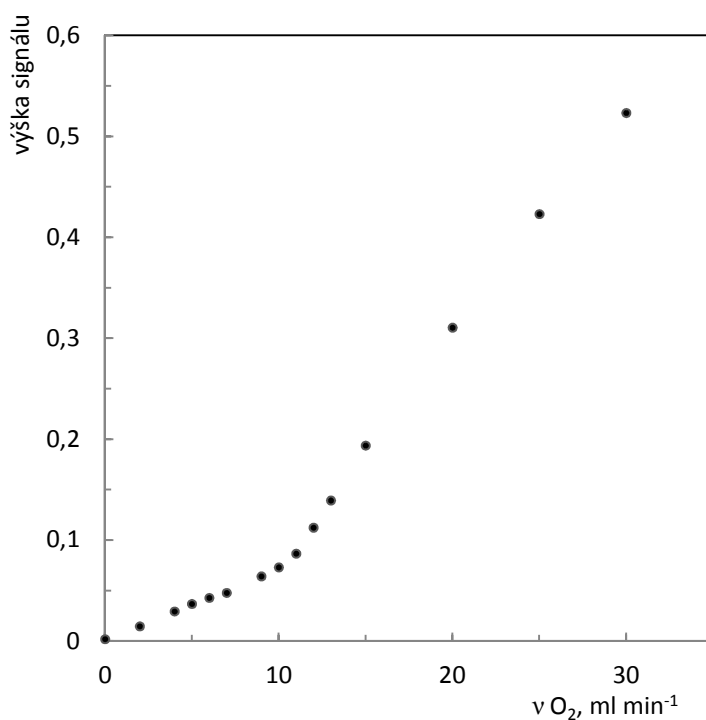
Tab. 3.2 Výsledné hodnoty průtoků kyslíku stanovené na analytické čáře As (193,7 nm), čerpání odpadu - 6,0 ml min⁻¹; v – průtok

měření č.	v_{O_2} ml min ⁻¹
1	12,4±1,0
2	11,0±0,4
3	10,3±0,3

Stejný experiment byl proveden na analytické čáře selenu. Bylo zjištěno, že na čáře selenu (196,0 nm) je při stanovení kyslíku dosaženo asi dvakrát vyšší citlivosti, než na analytické čáře pro arsen (193,7 nm) [41].

Obr. 3.6 ukazuje, že při stanovení na čáře selenu se méně projevuje nespecifická absorpce vody. Vzhledem k tomu, a také kvůli vyšší nespecifické absorpci kyslíku, je zde bod stechiometrie mnohem výraznější, což usnadňuje vyhodnocení.

V Tab. 3.3 jsou uvedeny výsledné hodnoty průtoků kyslíku a jejich nejistoty. Průtoky vodíku jsou dle stechiometrie dvojnásobné.



Obr. 3.6 Závislost výšky signálu na průtoku kyslíku

$$c_{NaBH_4} = 1,00 \%, c_{HCl} = 2 \text{ mol l}^{-1}$$

Hodnota průtoku kyslíku v bodě stechiometrie byla získána proložením závislosti dvěma přímkami a výpočtem společného bodu na ose x (průsečíku) z regresních rovnic těchto přímek (viz Obr. 3.5).

Tab. 3.3 Výsledné hodnoty průtoků kyslíku stanovené na analytické čáře Se (196,0 nm), čerpání odpadu - $5,6 \text{ ml min}^{-1}$; v – průtok

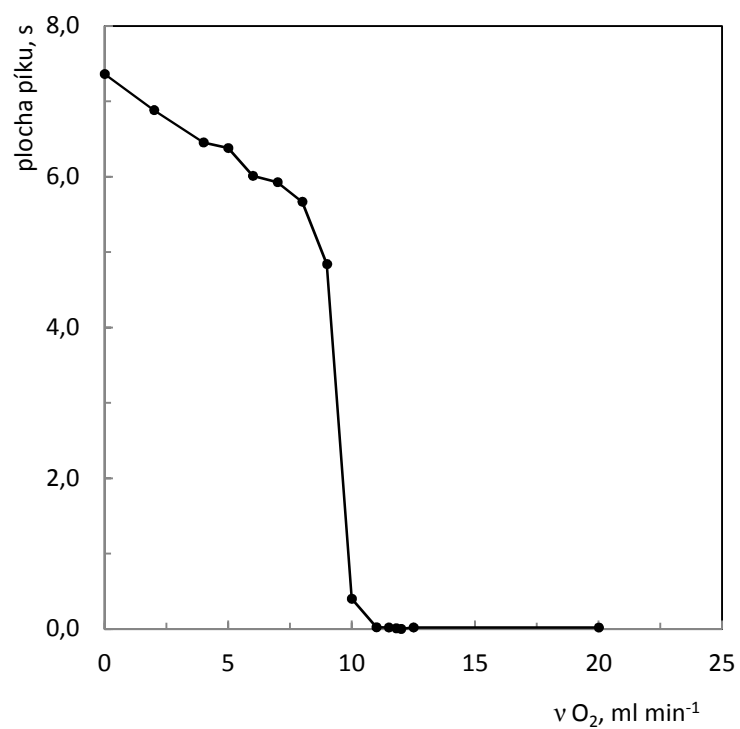
měření č.	$v \text{ O}_2$ ml min^{-1}
1	$10,3 \pm 0,5$
2	$10,0 \pm 0,6$
3	$10,2 \pm 0,6$

Výhodnější je u tohoto přístupu měření na analytické čáře selenu. Jedním z důvodů jsou nižší hodnoty nespecifické absorpce vody. Dále v tomto případě dochází, oproti měření na čáře arsenu, ke zvýšení nespecifické absorpce kyslíku. Díky tomu je bod stechiometrie mnohem výraznější a vyhodnocení jednodušší. Také opakovatelnost jednotlivých stanovení je v tomto případě lepší.

3.2.4 „Titrace“ vodíku kyslíkem – indikace detekcí volných atomů analytu

U tohoto přístupu ke stanovení množství vodíku byly generovány hydridy arsenu a selenu v uspořádání FIA a v uspořádání CFA. Byla sledována závislost plochy píku na průtoku kyslíku přiváděného kapilárou do atomizátoru. V bodě stechiometrie signál poklesl na nulovou hodnotu, jelikož došlo ke spotřebování veškerého vodíku, jehož přítomnost je nezbytná pro atomizaci.

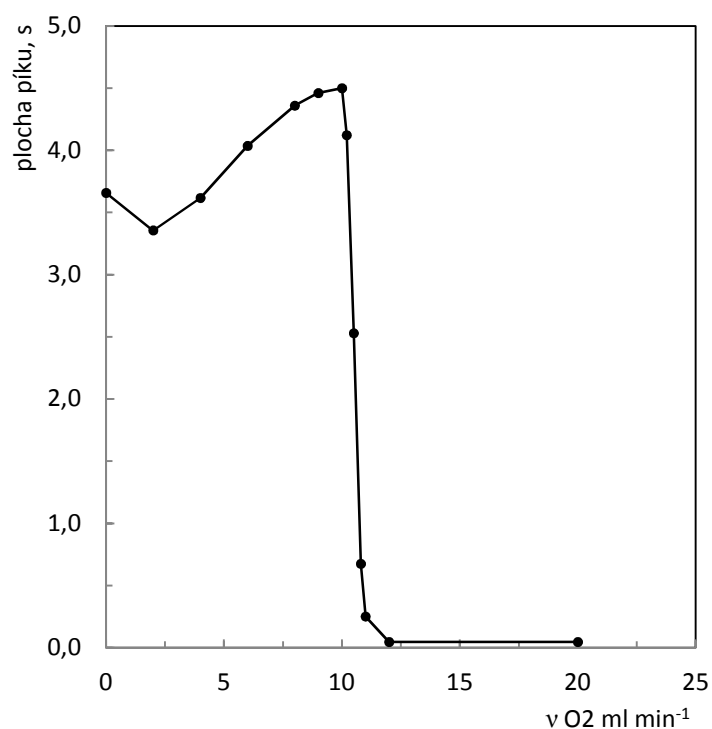
Průběh závislosti měřené se standardem arsenu v uspořádání FIA je znázorněn na Obr. 3.7.



Obr. 3.7 Vliv kyslíku na generování arsanu z iAs^{III} v prostředí HCl, $\lambda = 193,7 \text{ nm}$

$c_{iAs^{III}} = 40 \mu g \text{ l}^{-1}$, $c_{NaBH_4} = 1,00 \%$, $c_{HCl} = 2 \text{ mol l}^{-1}$

Stejný experiment byl proveden i se standardem selenu. Výsledná závislost je znázorněna na Obr. 3.8.



Obr. 3.8 Vliv kyslíku na generování selanu z Se^{IV} v prostředí HCl , $\lambda = 196,0 \text{ nm}$

$$c_{\text{SeIV}} = 40 \mu\text{g l}^{-1}, c_{\text{NaBH}_4} = 1,00 \%, c_{\text{HCl}} = 2 \text{ mol l}^{-1}$$

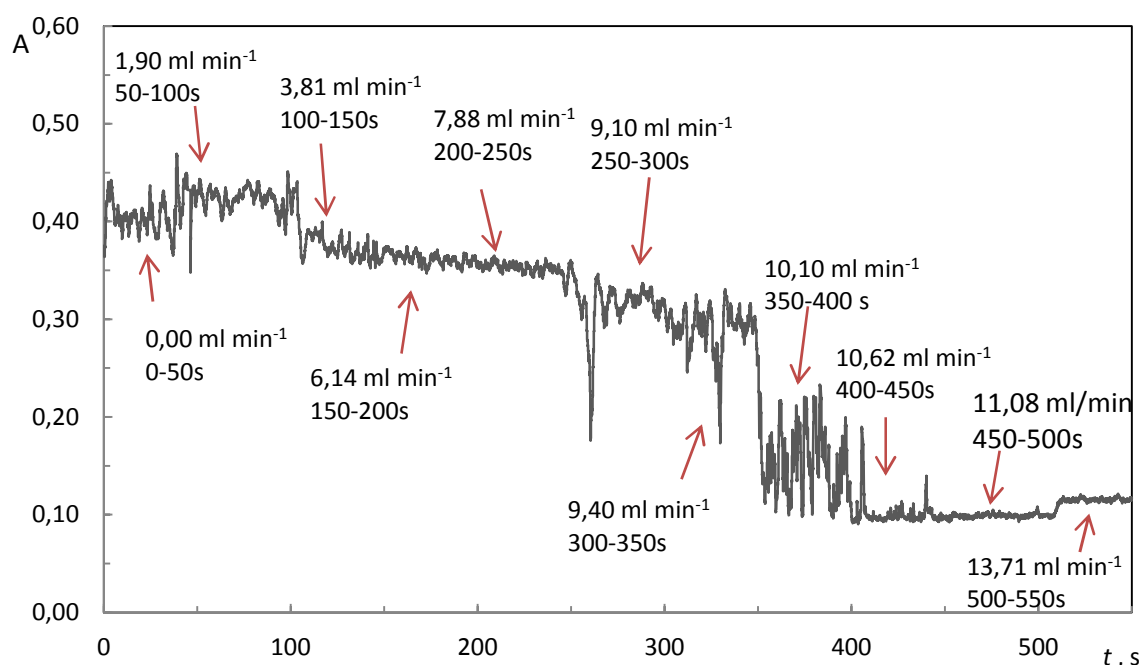
Hodnoty průtoků kyslíku v bodě stechiometrie byly vyhodnoceny metodou lineární interpolace. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3.4 jako průměr a směrodatná odchylka. Směrodatná odchylka byla vypočítána ze čtyř měření u selenu a ze dvou měření u arsenu. Neurčitosti uvedené v tabulce ilustrují velmi dobrou opakovatelnost jednotlivých stanovení. Rozdíl v hodnotách nalezených pro generování arsenu a selanu je způsoben tím, že obě tyto série měření byly provedeny v odlišné dny.

Tab. 3.4 Průtoky kyslíku stanoveny z bodu stechiometrie, uspořádání FIA, čerpání odpadu – $6,00 \text{ ml min}^{-1}$; \bar{v} - průtok, s – směrodatná odchylka

analyt	\bar{v}	s
	ml min^{-1}	ml min^{-1}
iAs ^{III}	9,57	0,04
Se ^{IV}	10,56	0,03

Tento přístup ke stanovení průtoku vodíku do atomizátoru je velmi exaktní, avšak také experimentálně a časově náročný. Z těchto důvodů byl použit přístup s kontinuálním uspořádáním generátoru popsany níže.

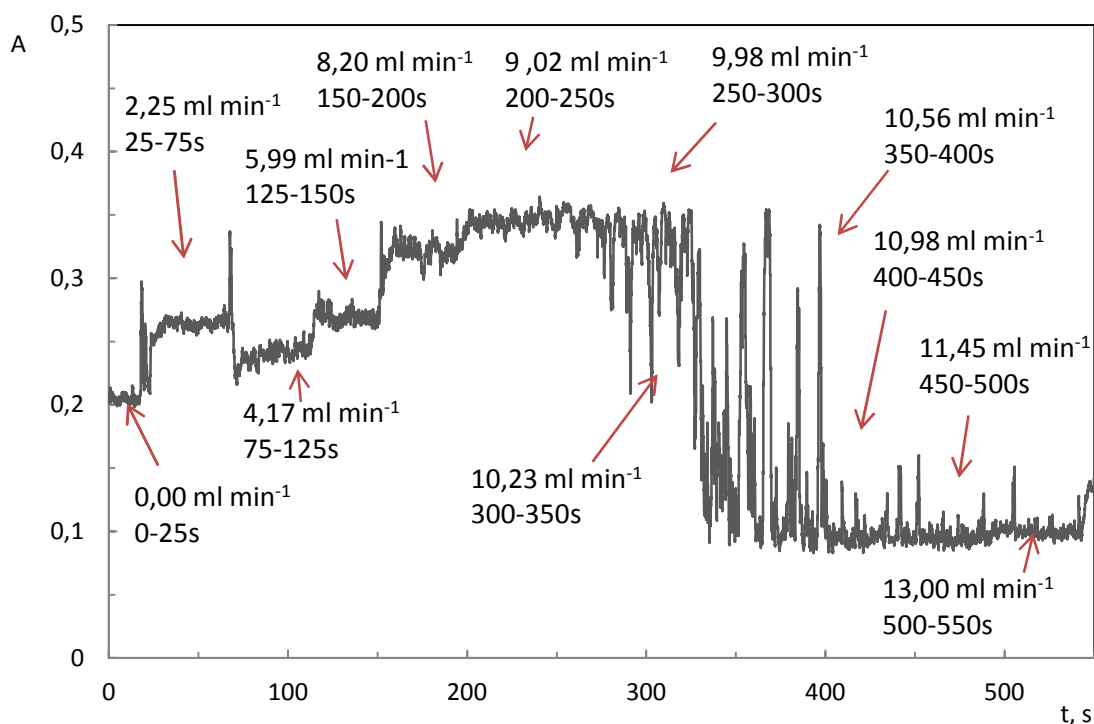
Na Obr. 3.9 je znázorněn záznam generování arsanu v uspořádání CFA. V grafu jsou uvedeny časy, ve kterých byl změněn průtok kyslíku do kapiláry.



Obr. 3.9 Vliv kyslíku na generování arsanu z iAs^{III} v uspořádání CFA

$c_{\text{iAsIII}} = 40 \mu\text{g l}^{-1}$, $c_{\text{NaBH}_4} = 1,00 \%$, $c_{\text{HCl}} = 2 \text{ mol l}^{-1}$

Obdobně bylo měřeno i se selenem a záznam měření je znázorněn na Obr. 3.10.



Obr. 3.10 Vliv kyslíku na generování selanu z Se^{IV} v uspořádání CFA

$$c_{\text{SeIV}} = 40 \mu\text{g l}^{-1}, c_{\text{NaBH}_4} = 1,00 \%, c_{\text{HCl}} = 2 \text{ mol l}^{-1}$$

Šum signálu je způsoben nerovnoměrným, nepravidelně pulzujícím přívodem vodíku z generátoru do atomizátoru. To je inherentní vlastnost experimentálního uspořádání, kterou nelze změnit.

Hodnota průtoku kyslíku v bodě stechiometrie byla opět stanovena jako taková, která odpovídá polovině výšky signálu. Výsledné hodnoty průtoků kyslíku jsou zaznamenány v Tab. 3.5. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka ze čtyř měření pro selen a z osmi měření pro arsen.

Tab. 3.5 Výsledné hodnoty průtoků kyslíku, uspořádání CFA, čerpání odpadu – 6,0 ml min⁻¹; \bar{V} - průtok, s – směrodatná odchylka

analyt	\bar{V}	s
	ml min ⁻¹	ml min ⁻¹
iAs ^{III}	10,1	0,1
Se ^{IV}	10,3	0,1

Přístupy použité pro stanovení množství vodíku přicházejícího do atomizátoru byly porovnány a jako nejvhodnější byla pro další měření zvolena „titrace“ vodíku s použitím standardu arsenu v uspořádání CFA. Tento přístup byl vybrán zejména díky své nižší experimentální náročnosti a celkově kratší době analýzy.

3.2.5 Aplikace metody stanovení přívodu vodíku do atomizátoru

Metoda stanovení přívodu vodíku do atomizátoru - „titrace“ vodíku s použitím standardu arsenu v kontinuálním uspořádání, jejíž vývoj je popsán výše, byla použita pro porovnání množství vodíku vzniklé při generování arsenu v prostředí HCl a v prostředí TRIS pufru, bez i s předredukci L-cysteinem.

V Tab. 3.6 jsou shrnuty dosažené výsledky. Reakce NaBH₄ s TRIS pufrem probíhá bouřlivěji než reakce s HCl. Bylo tedy nutné zvýšit rychlost čerpání odpadu ze separátoru fází. Generování v prostředí HCl bylo provedeno jak pro rychlost čerpání odpadu, která je optimální pro HCl, tak pro rychlost čerpání, která je optimální pro reakci s TRIS pufrem. Zvýšením rychlosti odčerpávání zreagované směsi došlo k mírnému snížení množství vznikajícího vodíku. To je způsobeno nadměrným strháváním reakční směsi do odpadu.

Porovnání množství vodíku vzniklé v prostředí HCl a v prostředí TRIS pufru, bez i s předredukcí L-cysteinem bylo provedeno při stejné rychlosti čerpání odpadu ze separátoru fází do odpadu.

Množství vodíku, které vzniká v prostředí HCl a v prostředí TRIS pufru po předredukcí vzorku L-cysteinem, se liší o méně než 10 %, avšak při generování bez předredukce v prostředí TRIS pufru vzniká asi o 30 až 40 % vodíku méně. To znamená, že v tomto prostředí dochází ke kompletní hydrolýze podstatné části NaBH_4 až po odčerpání reakční směsi do odpadu. Rozdíly v signálech pozorované pro prostředí HCl a TRIS pufru v přítomnosti či v nepřítomnosti L-cysteinu (Obr. 3.2) s těmito pozorováními nekorelují. To je důležitý poznatek, který bude sloužit jako výchozí bod pro další výzkumy.

Tab. 3.6 *Výsledné hodnoty průtoků kyslíku v bodě stechiometrie, srovnání dvou reakčních médií; \bar{V} - průtok, s – směrodatná odchylka*

analyt	reakční médium	rychlost čerpání odpadu	\bar{V}	s
		ml min ⁻¹	ml min ⁻¹	ml min ⁻¹
iAs ^{III}	HCl	6,0	10,08	0,08
iAs ^{III}	HCl	9,8	9,82	0,07
iAs ^{III}	TRIS pufr	9,8	7,5	0,2
iAs ^{III} +2% L-cystein	TRIS pufr	9,8	10,58	0,07

3.3 Vliv parametrů atomizátorů a spektrometrů na základní analytické charakteristiky

V této kapitole jsou diskutovány experimenty provedené pro posouzení vlivu relevantních parametrů atomizátorů a atomových absorpčních spektrometrů na základní analytické charakteristiky stanovení As založeného na generování hydridů: citlivosti, zakřivení analytických grafů a mezí detekce a stanovitelnosti.

Za nejdůležitější analytickou charakteristiku byl zvolen LOD. LOD je dán rozptylem měření série slepých vzorků a citlivostí. Odhlédneme-li od kontaminace reagensů, rozptyl signálů pro slepé vzorky může být ovlivněn šumem spektrální lampy a detektoru, ztrátami záření v atomizátoru a šumem absorpčního prostředí v atomizátoru. Výsledný rozptyl signálů pro slepé vzorky je také ovlivněn volbou analytického signálu, t.j. zdali je zvolena výška či plocha píku, eventuálně integrační doba.

3.3.1 Srovnání šumu základní linie měření pro různé parametry atomizátorů a spektrometrů

Základní šum je ovlivněn šumem lampy a detektoru. K měření byly použity tři zdroje záření: výbojka s dutou katodou (HCL), superlampa a bezelektrodová výbojka (EDL). Superlampa se vyznačuje vyšší intenzitou záření než HCL a tedy i lepším poměrem signál/šum a nižšími hodnotami LOD a LOQ. EDL poskytuje v porovnání s HCL až o řád větší zářivý tok. Zvýšení intenzity záření je velmi důležité u prvků (As, Se, Te, Pb atd.), jejichž rezonanční čára leží pod 220 nm, neboť se zde podstatně uplatňuje absorpce záření okolní atmosférou a optickým systémem. Základem je tedy šum lampy registrovaný spektrometrem pro optickou cestu bez atomizátoru. První příspěvek k základnímu šumu způsobuje atomizátor, protože stíní část paprsku a dochází tak ke zmenšení zářivého toku dopadajícího na detektor. Další příspěvky pak zahrnují vyhřátí atomizátoru na atomizační teplotu a samotné generování.

Pro porovnání šumů základní linie za různých podmínek byla vždy naměřena série pěti měření. Z každého měření byla vypočtena směrodatná odchylka a výsledné

hodnoty jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka ze směrodatných odchylek jednotlivých měření v dané sérii. Veškeré hodnoty jsou udávány jako absorbance.

V Tab. 3.7 a v Tab. 3.8 jsou uvedeny výsledky pro Perkin-Elmer 503 a Perkin-Elmer Analyst 800.

Z Tab. 3.7 vidíme, že u všech zdrojů záření došlo při použití vlnové délky 189 nm ke zvýšení šumu. U EDL byla vyzkoušena šířka spektrálního intervalu 2 nm a zde bylo naopak zaznamenáno snížení šumu. Důvodem je, že s rostoucí šířkou štěrbin se zvyšuje intenzita záření, ovšem za cenu zhoršení linearit kalibračních závislostí. Po umístění atomizátoru do optické cesty vzrostl šum nejvíce u EDL a nejméně u superlampy. K dalšímu nárůstu, tentokrát nejvíce patrného u HCL, došlo po vyhřátí atomizátoru na 900 °C. Po spuštění generování došlo už jen k malému zvýšení šumu. U generování v prostředí HCl a TRIS pufru nebyl zaznamenán významný rozdíl. Nejmenšího šumu lze dosáhnout při použití EDL a naopak největší šum je u HCL.

Výsledky v Tab. 3.8 ukazují, že v případě EDL a HCL došlo při použití vlnové délky 189 nm k výraznému zvýšení šumu. U superlampy se hodnota šumu naopak snížila asi o 10 %. Stejně jako u předchozího spektrometru byla vyzkoušena šířka spektrálního intervalu 2 nm a došlo zde k výraznému snížení šumu. Po umístění atomizátoru do optické cesty vzrostl šum výrazně ve všech případech a po vyhřátí atomizátoru na 900 °C se již hodnota šumu signifikantně nezměnila. Po spuštění generování se u EDL a HCL šum výrazně nezměnil a v případě superlampy došlo k jeho snížení. Nejmenšího šumu lze, stejně jako u předchozího spektrometru, dosáhnout při použití EDL a naopak největší šum je u HCL.

Tab. 3.7 Hodnoty šumů Perkin-Elmer 503; λ – vlnová délka, \bar{x} – průměr, s – směrodatná odchylka

uspořádání	šířka	λ	EDL		HCL		superlampa	
	šterbiny							
	nm	nm	$\bar{x} \cdot 10^{-4}$	$s \cdot 10^{-4}$	$\bar{x} \cdot 10^{-4}$	$s \cdot 10^{-4}$	$\bar{x} \cdot 10^{-4}$	$s \cdot 10^{-4}$
bez atomizátoru	0,7	193,7	6,98	0,33	28,47	0,87	20,6	1,4
bez atomizátoru	0,7	189,0	9,75	0,45	51,6	2,5	31,8	1,8
bez atomizátoru	2,0	193,7	5,04	0,30	-	-	-	-
studený atomizátor	0,7	193,7	9,43	0,38	35,6	2,3	22,35	0,43
atomizátor 900 °C; Ar, 75 ml min ⁻¹	0,7	193,7	10,3	1,2	48,1	2,8	22,79	0,97
generování; HCl	0,7	193,7	11,10	0,28	45,3	1,3	24,2	1,4
generování; HCl	0,7	189,0	17,56	0,43	-	-	-	-
generování; TRIS pufr	0,7	193,7	11,91	0,69	46,0	1,3	25,2	1,0

Tab. 3.8 Hodnoty šumů Perkin-Elmer Aanalyst 800; λ – vlnová délka, \bar{x} – průměr, s – směrodatná odchylka

uspořádání	šířka štěrbiny	λ nm	EDL		HCL		superlampa	
			$\bar{x} \cdot 10^{-4}$	$s \cdot 10^{-4}$	$\bar{x} \cdot 10^{-4}$	$s \cdot 10^{-4}$	$\bar{x} \cdot 10^{-4}$	$s \cdot 10^{-4}$
bez atomizátoru	0,7	193,7	3,549	0,025	137,4	1,1	51,93	0,31
bez atomizátoru	0,7	189,0	5,525	0,045	260,8	2,1	46,35	0,49
bez atomizátoru	2,0	193,7	2,065	0,038	38,40	0,49	-	-
studený atomizátor	0,7	193,7	5,94	0,12	274,5	3,0	75,62	0,53
atomizátor 900 °C; Ar, 75 ml min ⁻¹	0,7	193,7	5,94	0,20	287,2	3,2	76,8	2,1
generování; HCl	0,7	193,7	5,80	0,10	303,3	2,8	57,70	0,48
generování; HCl	0,7	189,0	10,15	0,31	-	-	-	-
generování; HCl	2,0	193,7	3,833	0,035	-	-	-	-

V Tab. 3.9 jsou zaznamenány hodnoty šumů naměřené na přístroji GBC Savantaa.

Tab. 3.9 Hodnoty šumů GBC Savantaa; λ – vlnová délka, \bar{x} - průměr, s – směrodatná odchylka

uspořádání	šířka štěrbin nm	λ nm	HCL		superlampa	
			$\bar{x} \cdot 10^{-4}$	$s \cdot 10^{-4}$	$\bar{x} \cdot 10^{-4}$	$s \cdot 10^{-4}$
bez atomizátoru	0,7	193,7	44,77	0,23	25,15	0,47
bez atomizátoru	0,7	189,0	54,19	0,52	27,61	0,28
bez atomizátoru	2,0	193,7	-	-	15,33	0,25
studený atomizátor	0,7	193,7	46,60	0,46	27,84	0,22
atomizátor 900 °C; Ar, 75 ml min ⁻¹	0,7	193,7	47,05	0,70	28,06	0,29
generování; HCl	0,7	193,7	46,64	0,36	29,08	0,32

Obdobně jako v předchozích případech, i zde došlo při vlnové délce 189,0 nm k nárůstu šumu. U superlampy se při šířce spektrálního intervalu 2,0 nm hodnota šumu výrazně snížila. Po vložení atomizátoru do optické cesty došlo u obou lamp pouze k malému zvýšení šumu. Stejně tak tomu bylo i po vyhřátí atomizátoru a spuštění generování, kdy v obou případech již nedošlo k výraznému nárůstu hodnoty šumu.

U přístrojů Perkin-Elmer 503 a Perkin-Aanalyst 800 došlo u všech zdrojů záření při použití vlnové délky 189 nm ke zvýšení šumu. Při nastavení šířky spektrálního intervalu na 2 nm bylo u všech provedených měření naopak zaznamenáno jeho snížení. K největšímu nárůstu šumu došlo ve většině případů po umístění atomizátoru do optické cesty. Po vyhřátí atomizátoru na 900 °C a spuštění generování se ve většině případů

šum již výrazně nezvýšil. Nejmenšího šumu bylo dosaženo při použití EDL a naopak největší šum je u HCL. U přístroje GBC Savantaa došlo při nastavení vlnové délky 189,0 nm nebo při nastavení šířky spektrálního intervalu 2,0 nm ke stejným změnám jako u předchozích spektrometrů. Vložením atomizátoru do optické cesty se šum již výrazně nezvýšil a stejně tak tomu bylo i po vyhřátí atomizátoru a spuštění generování.

3.3.2 Perkin-Elmer 503: kalibrační závislosti, LOD a LOQ

Kalibrační závislosti byly proměřeny za účelem posouzení citlivosti a odhadu hodnot meze detekce a meze stanovitelnosti.

Pro měření byl použit pracovní roztok iAs^{III} o koncentraci 5; 10; 20; 40 $\mu g\ l^{-1}$. Kalibrační závislosti byly měřeny v uspořádání FIA a v uspořádání CFA. V uspořádání FIA byla vyhodnocena plocha i výška signálu. Pro každou koncentraci bylo měření opakováno třikrát a jednotlivé výsledky se signifikantně nelišily. Výsledky v tabulkách jsou uvedeny jako aritmetický průměr.

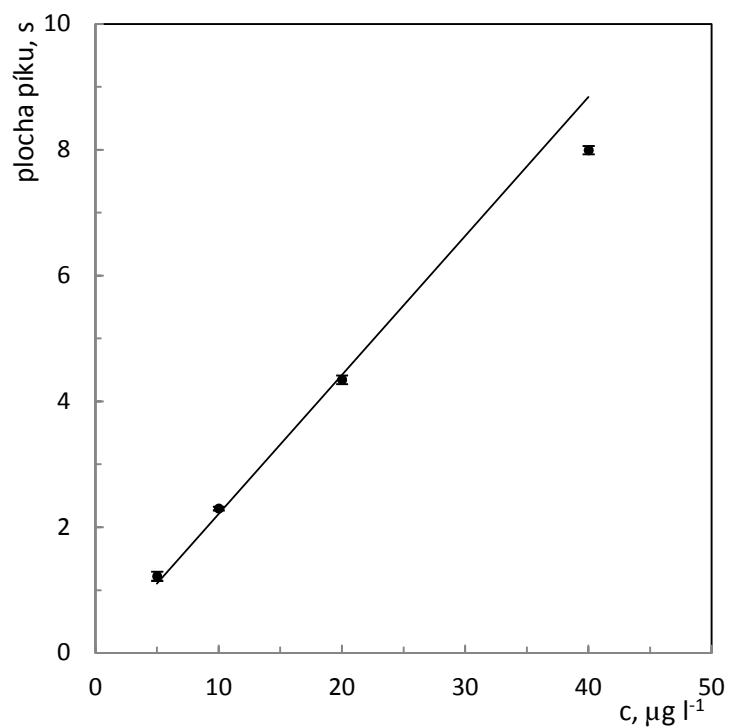
Pro zjištění meze detekce a meze stanovitelnosti bylo naměřeno 30 hodnot slepého vzorku v uspořádání FIA a 20 hodnot slepého vzorku v uspořádání CFA. Meze detekce a stanovitelnosti byly vypočítány podle vzorců uvedených v experimentální části (2.5.2).

3.3.2.1 Bezelektrodová výbojka

Kalibrační závislosti byly měřeny a porovnány pro dvě reakční média: roztok HCl o koncentraci 2 $mol\ l^{-1}$ a roztok TRIS pufru o koncentraci 0,75 $mol\ l^{-1}$ (pH=6). Jako redukční činidlo byl použit $NaBH_4$ o koncentraci 1,00 %. Při všech měření byla použita sušící trubice.

Kalibrační závislost iAs^{III} měřená v prostředí HCl metodou FIA je znázorněna na Obr. 3.11.

U koncentrace arsenu 40 $\mu g\ l^{-1}$ již docházelo k zakřivení kalibrační závislosti.



Obr. 3.11 Kalibrační závislost iAs^{III} měřená s použitím bezelektrodové výbojky; směrnice 0,2209x, korelační koeficient 0,9973

$c_{iAs^{III}} = 5; 10; 20; 40\ \mu g\ l^{-1}$, $c_{HCl} = 2\ mol\ l^{-1}$, $c_{NaBH_4} = 1,00\ \%$

V Tab. 3.10 jsou shrnuty směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti pro měření v prostředí HCl a v prostředí TRIS pufru v uspořádání FIA.

Porovnání bylo také stanovení při vlnových délkách 193,7 nm a 189,0 nm v prostředí HCl.

Tab. 3.10 Meze detekce a stanovitelnosti měřené pomocí bezelektrodové výbojky, uspořádání FIA, reakční médium HCl, TRIS pufr, vlnová délka 193,7 nm a 189,0 nm; a – směrnice kalibrační závislosti, λ – vlnová délka

způsob vyhodnocení	λ nm	reakční médium	a (plocha/výška) $s\ 1\ \mu g^{-1} / 1\ \mu g^{-1}$	LOD $\mu g\ l^{-1}$	LOQ $\mu g\ l^{-1}$
plocha	193,7	HCl	0,221	0,34	1,1
	189,0	HCl	0,272	0,37	1,2
	193,7	TRIS pufr	0,200	0,37	1,1
	193,7	TRIS pufr ^b	0,222	0,26	0,86
výška	193,7	HCl	0,011	0,16	0,52
	189,0	HCl	0,014	0,27	0,91
	193,7	TRIS pufr	0,011	0,19	0,62
	193,7	TRIS pufr ^b	0,012	0,14	0,45

^b - iAs^{III} ve 2% roztoku L-cysteinu

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že meze detekce a stanovitelnosti získané pro generování arsanu v prostředí HCl a TRIS pufru nejsou výrazně odlišné.

Při měření s vlnovou délkou 189 nm došlo ke zvýšení citlivosti, ale meze detekce a stanovitelnosti jsou kvůli vyššímu šumu horší.

V Tab. 3.11 jsou shrnuty směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti pro generování v prostředí HCl a v prostředí TRIS pufru v uspořádání CFA.

Tab. 3.11 Meze detekce a stanovitelnosti měřené pomocí bezelektrodové výbojky, uspořádání CFA, reakční médium HCl, TRIS pufr; a – směrnice kalibrační závislosti

reakční médium	a	LOD	LOQ
	$\text{l } \mu\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$
HCl	0,013	0,092	0,31
TRIS pufr	0,012	0,20	0,67
TRIS pufr ^b	0,014	0,15	0,49

b - $i\text{As}^{\text{III}}$ ve 2% roztoku L-cysteinu

Z Tab. 3.11 vyplývá, že při použití kontinuálního generátoru je dosaženo vyšší citlivosti, než při generování v uspořádání FIA. Jak již bylo uvedeno v teoretické části, výška signálu v uspořádání FIA je vždy menší a je dána rozsahem disperze v kapalně i plynné fázi. Meze detekce a stanovitelnosti získané pro měření v TRIS pufru se pro obě uspořádání výrazně neliší. Při použití HCl jsou v uspořádání CFA meze detekce a stanovitelnosti téměř o polovinu nižší než u FIA.

3.3.2.2 Výbojka s dutou katodou

Na základě předchozích výsledků byly kalibrační závislosti měřeny pouze v prostředí HCl o koncentraci 2 mol l^{-1} . Jako redukční činidlo byl použit NaBH_4 o koncentraci 1,0 %. Při všech měřeních byla použita sušicí trubice.

K zakřivení kalibračních grafů docházelo u koncentrace arsenu $40 \mu\text{g l}^{-1}$.

V Tab. 3.12 jsou shrnuty směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti pro uspořádání FIA i CFA. Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr.

Tab. 3.12 Meze detekce a stanovitelnosti měřené pomocí výbojky s dutou katodou, uspořádání FIA, CFA, reakční médium HCl; a – směrnice kalibrační závislosti

způsob vyhodnocení	režim průtokové analýzy	a (plocha/výška) s $1 \mu\text{g}^{-1} / 1 \mu\text{g}^{-1}$	LOD $\mu\text{g l}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g l}^{-1}$
plocha	FIA	0,201	1,2	3,9
výška	FIA	0,011	0,67	2,2
	CFA	0,012	0,64	2,1

Citlivost je srovnatelná s citlivostí získanou při použití bezelektrodové výbojky, avšak meze detekce a stanovitelnosti jsou kvůli velkému šumu až čtyřikrát vyšší.

3.3.2.3 Superlampa

Pro měření kalibračních závislostí byla jako reakční médium použita kyselina chlorovodíková o koncentraci 2 mol l^{-1} . Jako redukční činidlo byl použit NaBH_4 o koncentraci 1,00 %. Při všech měřeních byla použita sušicí trubice.

K zakřivení kalibračních grafů docházelo u koncentrace arsenu $40 \mu\text{g l}^{-1}$.

V Tab. 3.13 jsou shrnuty směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti pro měření v uspořádání FIA i CFA. Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr.

V tabulce jsou uvedeny také výsledky měření se superlampou nastavenou jako výbojka s dutou katodou.

Tab. 3.13 *Meze detekce a stanovitelnosti měřené pomocí superlampy, uspořádání FIA, CFA, reakční médium HCl; a – směrnice kalibrační závislosti*

způsob vyhodnocení	režim průtokové analýzy	a (plocha/výška) s l μg^{-1} / l μg^{-1}	LOD $\mu\text{g l}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g l}^{-1}$
plocha	FIA	0,210	0,62	2,1
	FIA ^b	0,148	1,3	4,5
výška	FIA	0,012	0,27	0,89
	CFA	0,013	0,25	0,84
	FIA ^b	0,008	0,60	2,0
	CFA ^b	0,009	0,58	1,9

b – superlampa jako výbojka s dutou katodou

Citlivost dosažená při použití superlampy je srovnatelná s citlivostí získanou při použití bezelektrodové výbojky, nicméně meze detekce a stanovitelnosti jsou kvůli většímu šumu asi dvakrát vyšší. Při využití superlampy jako výbojky s dutou katodou se citlivost snížila a vzhledem k vyššímu šumu se zhoršily také meze detekce a stanovitelnosti.

3.3.3 Perkin-Elmer Aanalyst 800: kalibrační závislosti, LOD a LOQ

Pro měření kalibračních závislostí byl použit pracovní roztok iAs^{III} o koncentraci 5; 10; 20; 40 $\mu\text{g l}^{-1}$. Kalibrační závislosti byly měřeny v prostředí HCl o koncentraci 2 mol l^{-1} . Jako redukční činidlo byl použit NaBH_4 o koncentraci 1,00 %. Generování bylo

prováděno v uspořádání FIA. Při všech měřeních byla použita sušící trubice. Pro každou koncentraci bylo měření opakováno třikrát a jednotlivé výsledky se signifikantně nelišily. Výsledky v tabulkách jsou uvedeny jako aritmetický průměr.

Pro zjištění mezí detekce a stanovitelnosti bylo naměřeno 30 hodnot slepého vzorku. Meze detekce a stanovitelnosti byly vypočítány podle vzorců uvedených v experimentální části (2.5.2).

3.3.3.1 Bezelektrodová výbojka

V Tab 3.14 jsou uvedeny směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti pro měření při vlnových délkách 193,7 nm a 189,0 nm. K zakřivení kalibračních grafů docházelo u koncentrace arsenu $40 \mu\text{g l}^{-1}$.

Tab. 3.14 Porovnání kalibračních závislostí pro vlnové délky 193,7 nm a 189,0 nm měřených pomocí bezelektrodové výbojky, uspořádání FIA, reakční médium HCl; a – směrnice kalibrační závislosti, λ – vlnová délka

způsob	λ	a	LOD	LOQ
vyhodnocení		(plocha/výška)		
	nm	s $1 \mu\text{g}^{-1}$ / $1 \mu\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$
plocha	193,7	0,103	0,17	0,56
	189,0	0,125	0,21	0,71
výška	193,7	0,006	0,10	0,35
	189,0	0,007	0,12	0,40

Uvedené výsledky ukazují, že při vlnové délce 189,0 nm lze dosáhnout vyšší citlivosti. Při této vlnové délce však dochází ke zvýšení šumu a zejména při vyhodnocení plochy píku také ke zvýšení mezí detekce a stanovitelnosti.

3.3.3.2 Výbojka s dutou katodou

V Tab. 3.15 jsou uvedeny směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti. K zakřivení kalibračních grafů docházelo u koncentrace arsenu $40 \mu\text{g l}^{-1}$.

Tab. 3.15 *Směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti pro výbojku s dutou katodou, uspořádání FIA, reakční médium HCl; a – směrnice kalibrační závislosti*

způsob vyhodnocení	a (plocha/výška)	LOD $\mu\text{g l}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g l}^{-1}$
	$\text{s } 1 \mu\text{g}^{-1} / 1 \mu\text{g}^{-1}$		
plocha	0,050	5,6	19
výška	0,003	3,4	11

Při použití výbojky s dutou katodou došlo v porovnání s bezelektrodovou výbojkou ke snížení citlivosti na polovinu. Také se v případě výbojky s dutou katodou velmi výrazně zvýšil šum a rovněž i meze detekce a stanovitelnosti.

3.3.3.3 Superlampa

V Tab. 3.16 jsou uvedeny směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti. K zakřivení kalibračních grafů docházelo u koncentrace arsenu $40 \mu\text{g l}^{-1}$.

Tab. 3.16 *Směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti pro superlampu, uspořádání FIA, reakční médium HCl; a – směrnice kalibrační závislosti*

způsob vyhodnocení	a (plocha/výška)	LOD	LOQ
	s $1 \mu\text{g}^{-1} / 1 \mu\text{g}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$	$\mu\text{g l}^{-1}$
plocha	0,074	0,57	1,9
výška	0,004	0,41	1,4

Vzhledem k citlivosti získané u bezelektrodové výbojky došlo u superlampy k jejímu poklesu. Hodnota šumu je u superlampy vyšší, což se negativně odráží na hodnotách mezí detekce a stanovitelnosti.

3.3.4 GBC Savantaa: kalibrační závislosti, LOD a LOQ

Pro měření kalibračních závislostí byl použit pracovní roztok iAs^{III} o koncentraci 5; 10; 20; 40 $\mu\text{g l}^{-1}$. Jako reakční médium byla použita HCl o koncentraci 2 mol l^{-1} a jako redukční činidlo byl použit NaBH_4 o koncentraci 1,00 %. Měřeno bylo v uspořádání FIA a CFA. Při všech měřeních byla použita sušicí trubice. Pro každou koncentraci bylo měření opakováno třikrát a jednotlivé výsledky se signifikantně nelišily. Výsledky v tabulkách jsou uvedeny jako aritmetický průměr.

Pro zjištění meze detekce a stanovitelnosti bylo provedeno 30 měření slepého vzorku. Meze detekce a stanovitelnosti byly vypočítány podle vzorců uvedených v experimentální části (2.5.2).

V případě tohoto spektrometru nebylo možné jako zdroj záření použít bezelektrodovou výbojku.

3.3.4.1 Výbojka s dutou katodou

V Tab. 3.17 jsou uvedeny směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti. K zakřivení kalibračních grafů docházelo u koncentrace arsenu $40 \mu\text{g l}^{-1}$.

Tab. 3.17 *Směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti pro výbojku s dutou katodou, uspořádání FIA, reakční médium HCl; a – směrnice kalibrační závislosti*

způsob vyhodnocení	a (plocha/výška)	LOD $\mu\text{g l}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g l}^{-1}$
	$\text{s l } \mu\text{g}^{-1} / \text{l } \mu\text{g}^{-1}$		
plocha	0,148	0,64	2,1
výška	0,008	0,42	1,4

3.3.4.2 Superlampa

Pro měření na tomto spektrometru byla použita integrovaná superlampa.

V Tab. 3.18 jsou uvedeny směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti. K zakřivení kalibračních grafů docházelo u koncentrace arsenu $40 \mu\text{g l}^{-1}$.

Tab. 3.18 *Směrnice kalibračních závislostí, meze detekce a stanovitelnosti pro superlampu, uspořádání FIA, CFA, reakční médium HCl; a – směrnice kalibrační závislosti*

způsob vyhodnocení	režim průtokové analýzy	a (plocha/výška) s l μg^{-1} / l μg^{-1}	LOD $\mu\text{g l}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g l}^{-1}$
plocha	FIA	0,165	0,34	1,1
	FIA	0,009	0,22	0,72
výška	CFA	0,009	0,21	0,69

Výsledky v Tab. 3.17 a Tab. 3.18 ukazují, že citlivosti se u obou zdrojů záření signifikantně neliší. Hodnoty mezí detekce a stanovitelnosti jsou ovlivněny také šumem základní linie a při použití superlampy je proto dosaženo dvakrát nižších hodnot LOD a LOQ.

4 Závěr

Předložená diplomová práce byla věnována optimalizaci parametrů speciální analýzy založené na selektivním generování hydridů v uspořádání přímého přenosu hydridů a on-line atomizace v atomovém absorpčním spektrometru.

Úkolem první části práce bylo přispět k porozumění procesů probíhajících při generování a atomizaci hydridů za podmínek speciální analýzy As založené na selektivním generování hydridů s použitím předredukčního činidla L-cysteinu. Pokud jde o atomizaci, bylo prokázáno, že dodatečný přívod vodíku do atomizátoru není k účinné atomizaci nutný. Zásadním poznatkem týkajícím se generování bylo, že použitý generátor hydridů, zahrnující miniaturní separátor fází, neposkytuje před odčerpáním reakční směsi do odpadu dostatek času pro postupnou konverzi pětimocné formy As na hydrid. Značné úsilí bylo věnováno stanovení množství vodíku přicházejícího do atomizátoru za různých podmínek generování. Byly vyvinuty dva zcela nové přístupy založené na "titraci" vodíku produkovaného v generátoru kyslíkem přiváděným do atomizátoru. Tyto přístupy se od sebe liší způsobem indikace. Přístup 1. je založen na sledování nespecifické absorpce kyslíku, přístup 2. je založen na známém faktu, že pro atomizaci hydridu je nutná přítomnost vodíku v atmosféře atomizátoru. Byla vyhodnocena pracnost a experimentální náročnost obou těchto přístupů, každého z nich v několika variantách. Optimální byl přístup 2. ve variantě se standardem arsenu v uspořádání kontinuální průtokové analýzy. Ten byl použit pro stanovení množství vodíku vzniklé v prostředí HCl a v prostředí TRIS pufru, bez i s předredukci L-cysteinem. Bylo zjištěno, že v prostředí TRIS pufru bez předredukce L-cysteinem dochází ke kompletní hydrolýze podstatné části NaBH_4 až po odčerpání reakční směsi do odpadu. To je důležitý poznatek, který bude sloužit jako výchozí bod pro další výzkumy.

Další část práce byla věnována charakterizování vlivu relevantních parametrů atomizátoru a atomových absorpčních spektrometrů na základní analytické charakteristiky stanovení As založeného na generování hydridů. Nejprve byly porovnány šumy základní linie měřené pro různé kombinace parametrů atomizátoru a spektrometrů. Takto byly charakterizovány tři spektrometry a tři zdroje záření. Na přístrojích Perkin-Elmer 503 a Perkin-Elmer Aanalyt 800 byl nejnižší šum dosažen při

použití bezelektrodové výbojky. Největší šum poskytovala výbojka s dutou katodou. U přístroje GBC Savantaa byla srovnána výbojka s dutou katodou a superlampa, která poskytovala nižší hodnoty šumu. Následně byly pro vybrané kombinace parametrů atomizátoru a spektrometrů stanoveny LOD a LOQ a také změřeny kalibrační závislosti. Na spektrometru Perkin-Elmer 503 bylo u všech použitých zdrojů záření dosaženo srovnatelné citlivosti. Hodnoty šumů zmiňované výše se však lišily, a tedy i hodnoty LOD a LOQ. Nejlepší hodnoty LOD a LOQ byly získány při použití bezelektrodové výbojky. Na přístroji Perkin-Elmer Aanalyst 800 byla nejvyšší citlivost stanovení získána při použití bezelektrodové výbojky. Také šum byl u této lampy nejnižší a proto i LOD a LOQ. U přístroje GBC Savantaa se citlivosti u výbojky s dutou katodou a superlampy výrazně nelišily, avšak při použití superlampy bylo díky nižšímu šumu dosaženo dvakrát nižších hodnot LOD a LOQ. Tyto výsledky budou cenným podkladem pro optimální volbu spektrometru a parametrů atomizátoru pro konkrétní analýzy.

5 Použitá literatura

1. **Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.:** Chemie prvků. *Praha, Informatorium (1993).*
2. **Hughes, M. F.:** Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters 133, 1–16 (2002).*
3. **Guha Mazumder, D. N.:** Chronic arsenic toxicity & human health. *Indian Journal of Medical Research 128, 436-447 (2008).*
4. **Wang, S.; Mulligan, C. N.:** Effect of natural organic matter on arsenic release from soils. *Environmental Geochemistry and Health 28, 197–214 (2006).*
5. **Jain, C. K.; Ali, I.:** Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research 34, 4304-4312 (2000).*
6. **Leermakers, M.; Baeyens, W.; De Gieter, M.; Smedts, B.; Meert, C.; De Bisschop, H. C.; Morabito, R.; Quevauviller, P.:** Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry 25, 1-10 (2006).*
7. **Mandal, B. K.; Suzuki, K. T.:** Arsenic round the world: a review. *Talanta 58, 201-235 (2002).*
8. **Wilson, H.; Miller, Jr.; Schipper, H. M.; Lee, J.S.; Singer, J.; Waxman, S.:** Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer research 62, 3893–3903 (2002).*
9. Arsenic. [Online] [Citace: 7. 4 2013.] Dostupné z: <<http://www.who.int>>.
10. **Cornelis, R.; Caruso, J.; Crews, H.; Heumann, K.:** Handbook of elemental speciation II – species in the environment, food, medicine and occupational health. *John Wiley & Sons, Chichester, England 2005*
11. **Stýblo, M.; Del Razo, L. M.; Vega, L.; Germolec, D. R.; LeCluyse, E. L.; Hamilton, G. A.; Reed, W.; Wang, C.; Cullen, W. R.; Thomas, D. J.:** Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of toxicology 74, 289-299 (2000).*

12. **Stýblo, M.; Drobná, Z.; Jasper, I.; Lin, S.; Thomas, D. J.:** The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. *Environmental Health Perspectives* 110, 767–771 (2002).
13. **Wang, S.; Mulligan, C. N.:** Occurrence of arsenic contamination in Canada: sources, behavior and distribution. *Science of The Total Environment* 366, 701-721 (2006).
14. **Maity, S.; Chakravarty, S.; Thakur, P.; Gupta, K. K.; Bhattacharjee, S.; Roy, B. C.:** Evaluation and standardisation of a simple HG-AAS method for rapid speciation of As(III) and As(V) in some contaminated groundwater samples of West Bengal, India. *Chemosphere* 54, 1199–1206 (2004).
15. **Komárek, J.:** Atomová absorpční spektrometrie. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2000.
16. **Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.:** Spektrometrické analytické metody I. Praha : Univerzita Karlova, Vydavatelství Karolinum, 1997.
17. **Welz, B; Sperling, M.:** Atomic Absorption Spectrometry. *Wiley-VCH, Weinheim* (1999).
18. **Dědina, J.; Tsalev, D. L.:** Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Wiley & Sons, Chichester* (1995).
19. **Dědina, J.:** Atomové absorpční a fluorescenční detektory pro speciální analýzu založenou na generování těkavých sloučenin. In: Inovace v atomové absorpční spektrometrii. Dědina, J.(ed.), Praha 2007.
20. **Dědina, J.:** Generation of volatile compounds for analytical atomic spectroscopy. *Encyclopedia of analytical chemistry R.A.Meyers*. 2010.
21. **Erxleben, H.; Růžicka, J.:** Atomic absorption spectroscopy for mercury, automated by sequential injection and miniaturized in lab-on-valve system. *Analytical Chemistry* 77, 5124-5128 (2005).
22. **Luna, A. S.; Sturgeon, R. E.; de Campos, R. C.:** Chemical vapor generation: Atomic absorption by Ag, Au, Cu, and Zn following reduction of aquo ions with sodium tetrahydroborate(III). *Analytical Chemistry* 72, 3523–3531 (2000).

23. **Holak, W.:** Gas-Sampling Technique for Arsenic Determination by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Analytical Chemistry* 41, 1712-1713 (1969).
24. **Hraníček, J.; Červený, V.; Rychlovský P.:** Stanovení ultrastopových koncentrací selenu a arsenu v pitných vodách metodou ECHG-QFAAS. *Chemické Listy* 104, 1196-1203 (2010).
25. **Červený, V.; Rychlovský, P.; Hraníček, J.; Šíma, J.:** Elektrochemické generování těkavých sloučenin pro potřeby spektrálních analytických metod. *Chemické Listy* 103, 652-660 (2009).
26. **Šíma, J.; Rychlovský, P.; Dědina, J.:** The efficiency of the electrochemical generation of volatile hydrides studied by radiometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy* 59, 125–133 (2004).
27. **Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.:** UV vapor generation for determination of selenium by heated quartz tube atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* 75, 2092-2099 (2003).
28. **Guo, X.; Sturgeon, R. E.; Mester, Z.; Gardner, G. J.:** Vapor generation by UV irradiation for sample introduction with atomic spectrometry. *Analytical Chemistry* 76, 240–2405 (2004).
29. **Kumar, A. R.; Riyazuddin, P.:** Mechanism of volatile hydride formation and their atomization in hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytical Sciences* 21, 1401-1410 (2005).
30. **D'Ulivo, A.; Dědina, J.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E.; Wang, Q.; Welz, B.:** Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 83, 1283–1340 (2011).
31. **D'Ulivo, A.:** Chemical vapour generation by tetrahydroborate(III) and other borane complexes in aqueous media. A critical discussion of fundamental processes and mechanisms involved in reagent decomposition and hydride formation. *Spectrochimica Acta Part, B: Atomic Spectroscopy* 59, 793-825 (2004).
32. **Gong, Z.; Lu, X.; Ma, M.; Watt, C.; Chris Le, X.:** Arsenic speciation analysis. *Talanta* 58, 77–96 (2002).

33. **Hsiung, T.-M.; Wang, J.-M.:** Cryogenic trapping with a packed cold finger trap for the determination and speciation of arsenic by flow injection/hydride generation/atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19, 923-928 (2004).
34. **Cai, I.:** Speciation and analysis of mercury, arsenic, and selenium by atomic fluorescence spectrometry. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* 19, 62-66 (2000).
35. **Dědina, J., Welz, B.:** Quartz tube atomizers for hydride generation atomic absorption spectrometry: mechanism for atomization of arsine. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 7 (1992).
36. **Dědina J.:** Atomization of volatile compounds for atomic absorption and atomic fluorescence spectrometry: On the way towards the ideal atomizer. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy* 62, 846-872 (2007).
37. **Grinberg, P.; Takase, I.; de Campos, C. R.:** Characterization and vapour phase interference studies of a flame heated holed quartz T-tube as atomization cell for hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14, 827-830 (1999).
38. **Dědina, J.; Matoušek, T.:** Multiple microflame-a new approach to hydride atomization for atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 15, 301-304 (2000).
39. **Matoušek, T.; Dědina, J.; Selecká, A.:** Multiple microflame quartz tube atomizer - further development towards the ideal hydride atomizer for atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B* 57, 451-462 (2002).
40. **Dědina, J.; D'Ulivo, A.; Lampugnani, L.; Matoušek, T.; Zamboni, R.:** Selenium hydride atomization, fate of free atoms and spectroscopic temperature in miniature diffusion flame atomizer studied by atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy* 53, 1777-1790 (1998).
41. **Kratzer, J.; Dočekal, B.; Heitmann, U.; Dědina, J.:** Spectral interferences of oxygen and water molecules in hydride generation atomic absorption spectrometry with quartz tube atomizers: Comparison of preconcentration and on-line atomization modes

for As and Se determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26, 2230-2237 (2011).

42. **Ay, U.; Henden, E.:** Interferences in the quartz tube atomizer during arsenic and antimony determination by hydride generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy* 55, 951-958 (2002).

43. **Kumar, A. R.; Riyazuddin, P.:** Chemical interferences in hydride-generation atomic spectrometry. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* 29, 166-176 (2010).

44. **Batley, G.E.; Apte, S.C.; Stauber, J.L.:** Speciation and bioavailability of trace metals in water: progress since 1982. *Australian Journal of Chemistry* 57, 903-919 (2004).

45. **Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L. G.; Muntau, H.; Van Leeuwen, H. P.; Lobinski, R.:** Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry* 72, 1453–1470 (2000).

46. **Matoušek, T.; Hernández-Zavala, A.; Svoboda, M.; Langrová, L.; Adair, B. M.; Drobná, Z.; Thomas, D. J.; Stýblo, M.; Dědina, J.:** Oxidation state specific generation of arsines from methylated arsenicals based on L-cysteine treatment in buffered media for speciation analysis by hydride generation-automated cryotrapping - gas chromatography-atomic absorption spectrometry with the mult. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy* 63, 396-406 (2008).

47. **Maity, S.; Chakravarty, S.; Thakur, P.; Gupta, K. K.; Bhattacharjee, S.; Roy, B. C.:** Evaluation and standardisation of a simple HG-AAS method for rapid speciation of As(III) and As(V) in some contaminated groundwater samples of West Bengal, India. *Chemosphere* 54, 1199-1206 (2004).

48. **Chen, H.; Brindle, I. D.; Chun le, X.:** Prereduction of arsenic(V) to arsenic (III), enhancement of the signal, and reduction of interferences by L-cysteine in the determination of arsenic by hydride generation. *Analytical Chemistry* 64, 667-672 (1992).

49. **Welz, B.; Šucmanová, M.:** L-cysteine as a reducing and releasing agent for the determination of antimony and arsenic using flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry, Part 1. optimisation of the analytical parameters. *Analyst* 118, 1417-1423 (1993).
50. **Musil, S.; Matoušek, T.:** On-line pre-reduction of pentavalent arsenicals by thioglycolic acid for speciation analysis by selective hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy* 63, 685-691 (2008).
51. **Eckschlager K.:** Chemometrie I., II. Praha, Katedra anorganické chemie PřF UK Praha 1994
52. **Dědina, J.; Matoušek, T.:** Způsob atomizace těkavých sloučenin, zejména hydridů, stanovených prvků pro atomovou absorpční spektrometrii a zařízení k provádění tohoto způsobu AO 287635. 2001.
53. **Carrero, P.; Malavé A.; Burguera J. L.; Burguera M.; Rondón, C.:** Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry: investigation of the effects of the acid concentration of different reaction media on the generation of arsines. *Analytica Chimica Acta* 438, 195–204 (2001).